

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭58—9070

⑬ Int. Cl.³
G 01 N 33/54

識別記号

庁内整理番号
7906—2G

⑭ 公開 昭和58年(1983)1月19日
発明の数 5
審査請求 未請求

(全 31 頁)

⑮ 免疫分析用装置及びキット

⑯ 特 願 昭57—70576

⑰ 出 願 昭57(1982)4月28日

優先権主張 ⑱ 1981年4月29日 ⑲ イギリス
(GB) ⑳ 8113167

㉑ 1981年11月13日 ㉒ イギリス
(GB) ㉓ 8134353

㉔ 発 明 者 ジュリアン・ゴードン
スイス連邦国4144アルレスヘイ
ム・フインケラーヴェーグ40

㉕ 発 明 者 リチャード・ホークス
スイス連邦国4123アルシユヴィ

㉖ 発 明 者 エヴリン・ニディ

アメリカ合衆国60004イリノイ
州アーリントン・ハイツ・エヌ
・ストラットフォード・ロード
1830

㉗ 発 明 者 ハリー・トービン
スイス連邦国4123アルシユヴィ
ル・ビニンゲルシュトラッセ12

㉘ 出 願 人 チバーガイギー・アクチエンゲ
ゼルシャフト
スイス連邦国4002バーゼル・ク
リベツクシュトラッセ141

㉙ 代 理 人 弁理士 若林忠

明 細 書

1. 発明の名称

免疫分析用装置及びキット

2. 特許請求の範囲

(1) 抗原もしくは免疫グロブリンまたはそれら両方の1以上の溶液または懸濁液の分別量を支持体に直接接触させて適用することにより得られる、抗原または免疫グロブリンまたはそれら両方を境界を定めて吸着させた領域のあらかじめ選択された配列を含む多孔性固体支持体で構成される免疫分析用の装置、及びこのような装置であつて抗原または免疫グロブリン領域の外側または内側の残りの吸着場所は前記の抗原または免疫グロブリンとの反応性に関して非特異的である蛋白質の存在により飽和されている装置、並びにこれらの装置のいずれかを有するキットからなる群から選ばれ免疫分析用の新規な装置またはキット。

(2) 残りの吸着場所の飽和が、所望により生理食塩水溶液または他の適当な希釈剤またはそれら

の両方で希釈された全血清で、所望により支持体を乾燥後、また必要により支持体を高温で焼成後、室温でまたは温度を上げて処理することによつて行われる特許請求の範囲第1項に記載の装置。

(3) 固体支持体中の抗原が、ヒトバイオブシイ物質、哺乳類組織または細胞、または体液、菌類、原生動物、後生動物寄生体、バクテリア、マイコプラズマ、ビールスまたはこれらの標品からなる群から選択される特許請求の範囲第1項に記載の仕掛。

(4) 固体支持体がシート状である特許請求の範囲第1項に記載の装置。

(5) シートの厚さが約0.01~0.5mmである特許請求の範囲第4項に記載の装置。

(6) シートの厚さが約0.1mmである特許請求の範囲第4項に記載の装置。

(7) 固体支持体の材料が、

A) a) 寒天、アガロース；架橋アルギン酸；置換または架橋グワ－ガム、架橋デキストラ

ンポリマー及びデンプン、

b) 再生セルロース、セルロースエステル、混合セルロースエステル、セルロースエーテルから選択される天然炭水化物ポリマー及びそれらの合成による部分的変性、架橋または置換誘導体、

B) 蛋白質及びその誘導体からなる群から選択される窒素含有天然ポリマー、

C) ラテックス及びゴムからなる群から選択される天然炭化水素ポリマー、

D) a) ビニルポリマー及びその部分加水分解誘導体、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、

b) 前記ビニルモノマー間の、及び他のモノマー類とのコポリマー及びターポリマー、

c) ポリエステル及びポリアミド、

d) ポリウレタンまたはポリエポキシドからなる群から選択される、適当な多孔性構造を持つように調製される合成ポリマー、

E) アルカリ土類金属及びマグネシウムの、硫

酸塩または炭酸塩；アルカリ金属及びアルカリ土類金属及び（または）アルミニウム及び（または）マグネシウムのケイ酸塩；アルミニウムまたはケイ素の酸化物または水酸化物からなる群から選択される適当に多孔性のある状態で調製することのできる無機材料、

F) 上記の混合物またはコポリマーまたはグラフトコポリマー、

からなる群から選択されるものである特許請求の範囲第1項に記載の装置。

(8) 固体支持体の材料が硝酸とセルロースのエステルまたは炭素原子数が1~7の脂肪族カルボン酸とセルロースのエステル、またはそれらエステルの混合物である特許請求の範囲第7項に記載の装置。

(9) ニトロセルロースが硝酸セルロースエステルとして用いられ、炭素原子6個につき硝酸基が約3存在する特許請求の範囲第7項に記載の装置。

00「Millipore」(商標名)のニトロセルロースシ

ートを含む特許請求の範囲第8項に記載の装置。

01 境界を定めた抗原または免疫グロブリンの領域がドット（点）状である特許請求の範囲第1項に記載の装置。

02 境界を定めた抗原または免疫グロブリンの領域が2mm以下の径を有する微小点状である特許請求の範囲第1項に記載の装置。

03 境界を定めた抗原または免疫グロブリンの領域が幅2mm以下の線状である特許請求の範囲第1項に記載の装置。

04 配列が抗原または免疫グロブリンの単一のドットからなる特許請求の範囲第1項に記載の装置。

05 抗原または免疫グロブリンがそれらを含む溶液または懸濁液の分別量を支持体に機械的に接触させて適用される特許請求の範囲第1項に記載の装置。

06 接触が手または機械によりピペットで行われるか、または液体あるいは気体の推進剤により行われる特許請求の範囲第15項に記載の装置。

07 微小ドットが1μL以下の容量を固体支持体に適用することによつて形成される特許請求の範囲第16項に記載の装置。

08 核酸が固体支持体に適用され、次いでその支持体が60℃~120℃の温度で5分間~12時間焼成される特許請求の範囲第2項に記載の装置。

09 抗原または免疫グロブリン及び所望により阻止蛋白質またはそれらの組合せにより調製された固体支持体状の装置、免疫反応を行うために適当な装置、及び予め分別されるかまたは乾燥された形態のインジケータシステム用の試薬からなる特許請求の範囲第1項に記載のキット。

00 検出と定量を計算またはオートラジオグラフィによつて行う放射能でラベルしたインジケータ抗体からなるか；または検出と定量をフルオロメトリーによつて行う蛍光インジケータと結合されているか；または検出と定量をデンシトメトリー或いは肉眼で行う適当な基質との反応で呈色し得る酵素と結合されているか；また

は抗原-抗体コンプレックスに結合した補体蛋白質をベースとし、その補体は上記の3種の方法のいずれかにより、または別の特異な抗補体抗体（これも上記の3種の方法のいずれかにより標識化されている）により標識化されている検出及び定量システムからなる特許請求の範囲第19項に記載のキット。

020 免疫反応を行うための装置が、多数の空所部のあるプラスチック製の皿であり、試薬がインジケータ抗体、塩類、緩衝剤、血清または蛋白質キャリアの凍結乾燥混合物、及び予め量を決められたインジケータ酵素発色性基質、塩類、緩衝剤、並びに予め測定した容量の、全て適当にパッケージされた液状の基質を含むアンプルからなる特許請求の範囲第19項に記載のキット。

021 抗原-抗体反応が測定し得る信号で生ずる信号システム用の、1以上の特異抗体と試薬との配列を含む固体支持体からなる特許請求の範囲第1項に記載の装置またはキット。

ツクスの検出及び定量のための補体蛋白質を含む特許請求の範囲第1項に記載の装置またはキット。

022 特許請求の範囲第1項～第28項のいずれか1項に記載された装置またはキットを用いることを特徴とする人または動物の病気の診断、監視及び予後の免疫検定法による、特異抗原または特異抗体またはこの両者を検出及び定量するための方法。

023 研究及び開発におけるモノクローン及び他の抗原または抗体のスクリーニング、検出及び定量をするために用いる特許請求の範囲第29項記載の方法。

024 未知の抗原を固体支持体に適用して、公知の抗体を用いる免疫検定法により検出と定量を行うために用いる特許請求の範囲第29項記載の方法。

025 抗原もしくは免疫グロブリンまたはそれらの両方の1以上の溶液または懸濁液の分別量を直接接触により固体の多孔質支持体に適用してあらかじめ選択された配列を形成し、そして所望ならば、かくして得られた装置を前記の抗原または免疫グロブリンとの反応性に関して非特異

026 信号システムが、インジケータ酵素または酵素の結合シリーズのための基質、補因子または補欠分子族からなる特許請求の範囲第22項に記載の装置またはキット。

027 信号システムが抗原と信号分子との共有結合アダプツからなる特許請求の範囲第23項に記載の装置またはキット。

028 酵素または酵素の結合シリーズが特異抗体と共に固体支持体に適用される特許請求の範囲第23項に記載の装置またはキット。

029 酵素または酵素の結合シリーズが特異抗体とは別個に固体支持体に適用されるか、または全然適用されない特許請求の範囲第23項に記載の装置またはキット。

030 固体支持体上の配列が人または動物の免疫グロブリン、またはそれらのフラグメントを、リユーマチ因子の検出及び定量のために含む特許請求の範囲第1項に記載の装置またはキット。

031 固体支持体上の配列が循環免疫コンプレックスとして知られている循環抗原-抗体コンプレ

的である蛋白質で処理してその抗体または免疫グロブリン領域の内側または外側の残りの吸着場所を飽和させることを特徴とする免疫分析用装置の製造方法。

032 特許請求の範囲第1項～第28項のいずれか1項に記載された装置またはキットを非特異性蛋白質を含有するブロッキング溶液で適当に処理をして残りの結合場所を全て飽和させてのち検出すべき免疫学的因子を含有する試料と、好ましくはブロッキング溶液の存在下に、定温放置し、また所望により、洗浄後、インディケータ抗体溶液または試料と一次定温放置により生成した免疫学的錯体を認識するためのいずれかの信号システムと、好ましくはブロッキング溶液の存在下に定温放置し、インディケータシステムの展開および/または免疫因子の定量を行なうことを特徴とする免疫学的分析法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は免疫分析用の新規な装置、その製造方法、及びその用途特に多重因子抗体分析及び

交雑腫瘍 (hybridomas) 形成モノクローン抗体のスクリーニングに対する用途に関する。

患者の血清中の抗体を直接または間接に測定する試験は臨床的診断に広く用いられている。問題となつてゐる個々の抗体により、試験は確定した原理に従つて、すなわち免疫沈殿物の形成単独でまたは拡散及び(または)電気泳動と組合せて、抗体-抗原コンプレックスによる補体の固定により、抗体による赤血球の凝集により、または抗体の抗原に対する結合を直接測定することにより日常的に使用されている。これらの原理は全て過去または現在の病気の診断用に商業的に入手し得るキットとして種々用いられている。従つて特殊試験用キットはウイルス、バクテリア、菌類または寄生虫に感染した結果として生ずる抗体の検出または測定のために製造される。各試験用キットは特異抗体用に特別に作られる。

上述の予め作られた診断用キットに固有の障害は、病気に関係しない偽陽性反応が採用される操作の高感度のために起こることである。陽性の結果

チ熱におけるバクテリア感染に対する抗体は心筋組織と交差反応するおそれがあり；伝染性単核症 (infectious mononucellosis) においては、交差反応を起して、ウマのような他種の赤血球を凝集させる異原抗体が診断用キットとして用いられる。

この発明は以下に更に詳しく説明するように、抗体検出に基づく現存の分析用抗原試験についてのこれらすべての欠点を除去するものである。本発明は前記の思いがけない交差反応性の発見と意外な抗体の生成の発見を促進するであろう。

この発明は極めて単純で計画性があり、かつ例えば病気の診断において身体自身の病気-監視システムからの情報を最大限利用する詳細な“抗体プロフィール”を確立することのできる試験用キットの提供を目的とする。このキットは本質的な特徴としては、例えば薬剤やホルモンのような任意の抗体と抗原の両方の免疫分析または検出に適した抗原または免疫グロブリンのための固体支持体の形態での装置からなる。

本明細書では“抗体”の字句は、血液の免疫グ

ロブリンフラクションまたは免疫システムから導かれる培養細胞により分泌され、この明細書で“抗原”と呼ぶ相当するリガンドと特異的に反応する特徴を有する特殊な蛋白質分子を表わすものである。

は通常抗体力価の変化が病気の進行中に検出することができる場合にのみ意義がある。このことは迅速に結論を出すことを妨げる。公知の試験用キットを用いる場合には特殊な病気に先立つて抗体の基礎的レベルを患者のために入手することは不可能である。このことは、医師が日常的な健康管理業務として個人的にまたはヘルスセンターで十分実施することができるほどシステムが単純であり、同時に現在臨床的に関心があるか将来臨床的に関心が持たれる可能性があるあらゆる抗体の基礎的レベルを確立することができるに十分なほどシステムが融通性のある場合にのみ可能となるであろう。このような試験では、現在臨床に明らかに関連のない抗体に関するデータが収集される。しかし、抗体は極めて特異的ではあるが完全に特異的ではないので、思いがけない交差反応が起こることがある。これは思いがけない抗原交差反応によるか、または理由はわからないが、病気が免疫システムに悪性の作用を及ぼして意外な抗体を生成するかすることによる。従つて、例えばリウマ

ロブリンフラクションまたは免疫システムから導かれる培養細胞により分泌され、この明細書で“抗原”と呼ぶ相当するリガンドと特異的に反応する特徴を有する特殊な蛋白質分子を表わすものである。

第一に、この発明は1以上の抗原または免疫グロブリンの溶液または懸濁液の分別量を支持体に直接接触させて適用することにより得られる、抗原及び(または)免疫グロブリンの境界を定めて吸着させた領域のあらかじめ選択された (pre-selected) 配列を含む多孔性固体支持体からなる免疫分析用の新規な装置に関する。

前記固体支持体上の抗原または免疫グロブリンの吸着された領域は、分析する必要のある例えば血清のような液体中に含まれる抗体または抗原それぞれと適当な状態で反応させるために、支持体を乾燥、貯蔵して保持することができる。この発明は従つて特に前記の乾燥状態の仕掛を提供するものである。しかし、所望の免疫-検定 (immuno-assay) を実施する前に、適用する抗原または免

疫グロブリンによつてカバーされない領域内の多孔性支持体表面上での蛋白質の全ての吸着可能場所とその領域の内側は、非特異蛋白質またはその蛋白質を含む血清により表面を処理して飽和する必要がある。またこの処理中は最初に適用された抗原または免疫グロブリンは抗原-抗体反応を維持するように元の状態に保たれ、乾燥及び貯蔵中もそのままに保たれる。

本発明の第二の特色は、従つて1以上の抗原または免疫グロブリンの溶液または懸濁液の分別量を支持体に直接接触させて適用することにより得られ、かつ吸着表面の残りの吸着可能場所の全てを封鎖するために過剰の非特異蛋白質で処理した抗原及び(または)免疫グロブリンの境界を定めて吸着された領域のあらかじめ選択された配列を含む多孔性固体支持体からなる装置である。非特異蛋白質とは分析する血清中にあると考えられる特異抗体と交差反応をせず、かつ多孔性支持体に適用される抗原とも異なるような蛋白質を意味する。このようにして得られた、特に乾燥状態で、

見;及び抗原または免疫グロブリンは多孔性表面に極めて堅固に固着されて、實際上無制限の期間変化せずに保持することができ、生物学的液体中にある抗体との反応または抗原との反応にそれぞれ適しており、また公知の任意の免疫学的検定法による検出に適しているという発見に基づくものである。例えば、装置が固体支持体に結合した抗原からなる場合には、結合した抗体は(インジケータ)抗体を用いて、すなわち例えば放射能で標識化された(インジケータ)抗体または呈色反応する酵素と結合する(インジケータ)抗体を用いて検出される。"インジケータ"(Indicator)とは、それに結合した基、すなわち一定の条件下で検出することができ、かつ測定することのできる信号を発生する基を有する分子を意味する。

これらの免疫学上の検定は抗原または免疫グロブリンの非常に小さな点(ドット、dot)でも、施された種々の抗原または免疫グロブリンと試験溶液中に含まれる第三物質との間で干渉を起すことなく実施することができる。この発見は先行技

製造後貯蔵されて長期間使用することのできる免疫検定で直接用いられる装置は特に重要なものである。

本発明の第三の特色は前記の両方の装置を用いることからなる新しい免疫学上の分析法である。

本発明の第四の特色は1以上の抗原及び(または)免疫グロブリンの溶液または懸濁液を分別して支持体に直接接触させて適用することからなる、前記の装置の製造法である。

本発明の第五の特色は上記の固体支持体の形態での装置と免疫学上の検定を実施するために調製された薬剤と装備とを組合せたキットの製造に関するものである。

この発明は、抗原または免疫グロブリンがそれらを含む液体を固体多孔性支持体に直接接触させて適用され、境界の定められた吸着領域を得ることができ、その領域は所望により適用される液体の容量を適当に制限することによつて出来るだけ小さいものとしてできるという発見;そのようにして得られた領域は表面上を広がらないという発

術で知られている種々の免疫学的検定法、特に上述の検定法に比べると確かに驚くべきことである。この発明による簡単な装置とその適用法は極めて一般的に応用でき、實際上例えば蛋白質、核酸、炭水化物、脂質、及び関連物質、及びあらゆる種類の免疫グロブリンを含む全ての抗原物質に対して用いることができることは特に驚くべきことである。

この発明に先行する技術の状況は、エレクトロフェログラム(electropherogram)の模写物上で抗体結合検定を実施するのに微少多孔性シートを用いて決定的な進歩を果した Proc. Natl. Acad. Sci. USA 中で以下に述べた記事にある発見は別として、米国特許第4,200,690号及びヨーロッパ特許出願第27008号に例示されている。米国特許には、ニトロセルロースの単位面積あたり本来備わっている高い結合性に気づかずに種々の複雑なコーティング法によりニトロセルロース微細多孔性支持体の結合容量を増加させる方法が記載されている。更に、先のヨーロッパ特許出願に総括

されている初期の多数の特許には、渦巻、穴、挿入物等を有するプラスチック表面の種々の幾何図形を用いて結合容量を増大させることが記載されている。それらの表面から過剰の試薬を完全に除去することは困難であると述べられている。この発明の本質的な特徴は微細多孔性シートの高い結合容量を、例えば洗液をプラスチック製びん等により簡単に施して過剰の試薬を注ぎ出すことにより、容易に十分に洗浄することと組合せたものである。

前記のヨーロッパ特許出願第27008号には、同一の液体試料と接触しているコーティングされたチューブと挿入物とを用いて多重抗体-抗原反応を行う方法が記載されている。その特許出願の発明では同時に複数の検定ができるとされておりそのような多重検定の利点と必要性が広範囲に記載されているが、2つを同時に検定する例のみが記載され、2以上については実際には殆ど実施されなかつた。その発明の重要な特徴は反応後チューブと挿入物とを物理的に分けて、結合した放射

能を別々に算えることである。その発明で実施することのできる検定数はラジオイムノアッセイ(同位元素標識免疫定量法)と多重同位元素法(multiple isotope techniques)を用いることにより増やすことができるが、実際上は放射能測定が面倒なため2以上の同位元素を用いて日常的な使用で検定数を増やすことはできないことは明らかである。この方法では最大で同時に4つの分析が行われている。挙げられている例は専らラジオイムノアッセイにおける用途に対するものである。一方、この発明は微細多孔性支持体に本質的に備わっている高い分析力(high resolution)と組合せて、単位面積当りの高い容量を利用して同時に検定できる数を制限なく増加することができるようにするものである。更に、ヨーロッパ特許出願第27008号の例は、相当する抗原を測定するために、支持体に結合した特異抗体を使用するものに限定されている。この発明では本質的に制限のない数の種々の抗原を用いて対応する抗体を測定するためにシステムを使用することができる。

また抗体用の支持体を用いて、次に対応する特異抗原を結合させること、及び抗原-抗体コンプレックス、例えば補体成分を同定する特殊試薬を用いることもできる。

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, No. 9, 4350 ~ 4354頁, 1979年9月発行の"Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications" (蛋白質のポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースシートへの電気泳動による輸送: 操作と応用) という題名の記事には、蛋白質のゲルから多孔性シートへの電気泳動による輸送法とその蛋白質の抗体が関与する免疫検定法による検出が記載されている。蛋白質の電気泳動による輸送ではニトロセルロースシート上のゲル中に含まれる原図型の正確な模写物が得られる。このように模写されたエレクトロフェログラム(electropherogram, 電気泳動法)を用いる抗体分析は、ニトロセルロースシートの残留吸着容量を非特異蛋白質によつて浸漬

することにより飽和させた後行われ、この特色は本発明でも採用されるものである。電気泳動により輸送された蛋白質を用いる上述の免疫検定は、電気泳動により吸着された特異蛋白質と支持体の残留容量を封鎖するのに用いた非特異蛋白質との間に交換が起らないという事実によつて可能になるものである。残留吸着場所の封鎖(背景部吸着)に用いる非特異蛋白質の部分ではいかなる障害からも結合した抗原が元の状態で保存され、そして抗原及び(または)免疫グロブリンを直接、すなわち電場のない状態で適用する場合にも長期間抗体検定ができるという本発明の発見は、新しい装置の開発とその抗体分析への利用に対する決定的な要因である。また更に抗血清及びインジケータ抗体によりインキュベーションした場合に障害となる副反応、例えば吸着された非特異蛋白質による交換は起らないことも驚くべきことである。更に、先に述べた電気泳動法が改良されて抗原を簡単に直接適用することによつて定量分析の基礎となることは期待され得なかつた。抗原の多数の微

少ドットを備えた支持体に応用した時、この新しい方法は高い解像力を有するために、また同時に極めて操作が簡単なために、無限にプログラミングが可能である。本発明の免疫学的な抗体分析を定量的なものにする場合には免疫グロブリンを所望により抗原と共に多孔性支持体に施すことができる；免疫グロブリンの既知量を固体支持体に抗原と共に適用する；この免疫グロブリンはインジケータ抗体と検出する反応を起し、この反応が抗原に結合した免疫グロブリンの対応する反応と比較するベースとして用いられる。本発明の免疫学的分析法は、従つて例えば人免疫グロブリン等の既知量をベースとした適当な内部標準を用いて目盛づけすることができる。この方法は抗体を多数同時に測定することができるので、他の抗原と交差反応を起したり、病気にによりもたらされ、以前には知られていなかった、偶発的に引出される抗体が容易に検出される。更に、個々の抗体の測定に依存している従来の全ての診断試験を普遍的な1つの試験に統合することができる。

(modified)ゼラチンのような含窒素天然ポリマー、

C) ラテックス及びゴムのような天然の炭化水素ポリマー、

D) a) ビニルポリマー類、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル及びその部分加水分解誘導体、ポリアクリレート、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、

b) 前記のビニルモノマーそれ自体の間の、及び他のモノマーとのコポリマー及びターポリマー、

c) ポリエステル、ポリアミドのようなポリ縮合物、

d) ポリウレタンまたはポリエポキシドのような付加ポリマー、

E) アルカリ土類金属及びマグネシウムの硫酸塩または炭酸塩例えば硫酸バリウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、またはアルカリ金属及びアルカリ土類金属及び、

本発明の装置上に形成される配列に関して使用された「あらかじめ選択された (pre-selected)」なる語は吸着された抗原または免疫グロブリンの領域の外面的形態 (geometry) が意図された免疫学的分析の目的のために役立つようになっていることを意味するものである。

多孔性支持体は十分な多孔度を持ち免疫グロブリンが接近でき、適当な表面親和力があり抗原と結合する任意の材料である。微細多孔性の構造が一般に好ましいが水和状態のゲル構造を有する材料をも使用することができる。化学的な性質に関して、この材料は：

A) a) 寒天、アガロース；架橋アルギン酸；置換または架橋グワ－ガム、架橋デキストランポリマー及びデンプン

b) 再生セルロース；セルロースエステル特に硝酸及びカルボン酸とのエステル；混合セルロースエステル、セルロースエーテル特に低級脂肪族アルコールとのエーテル、

B) 蛋白質及び誘導体、例えば架橋または修飾

(または) アルミニウム及び(または) マグネシウムのケイ酸塩、及びアルミニウムまたはケイ素の酸化物または水酸化物例えば粘土、アルミナ、タルク、カオリン、ゼオライト、シリカゲル、ガラスのように適当に多孔性のある状態で調製することのできる無機材料、

F) 上記の混合物またはコポリマー、例えば予め存在するポリマーに合成ポリマーを開始剤重合して得られるグラフトコポリマーである。

これらの材料は全て適当な形状、例えばフィルム、シート、プレート、シリンダー等の形状で用いられるか、適当な不活性キャリア、例えば紙、ガラス、プラスチックフィルム、金属箔、織物等にコーティングされるか、または接着されるか、またはラミネートされる。この装置は好ましくはシート状であり、その厚さは約 $0.01 \mu \sim 0.5 \text{ m}$ 、好ましくは約 0.1μ である。孔の大きさは広い範囲で変えられるが、好ましいのは約 $0.025 \sim 15 \mu$ 、特に約 $0.15 \sim 15 \mu$ である。

これら支持体の表面は抗原及び(または)免疫

グロブリンが支持体と共有結合を生ずる化学的方法によつて活性化させることができる。しかし、抗原または抗体の不可逆結合は一般に、十分理解されてはいない疎水力による多孔性材料への吸着によつて達成される。微細多孔性セルロースエステル、例えばセルロースと炭素原子数が1~7のアルカルボン酸（酢酸、プロピオン酸、任意の酪酸または吉草酸等）のような脂肪族カルボン酸とのエステルを用いるのが好ましい。しかしながら、ニトロセルロースのシート、すなわちセルロースの硝酸エステルのシートを所望により前記のカルボン酸セルロースエステルのいずれかと混合して用いるのも有利である。従つて純粋のニトロセルロースエステルは炭素原子数6個に対して約3個の硝酸基を持つセルロースエステルの構成で用いることができる。本発明による装置を作成するためのニトロセルロースをベースとする優れた材料は商標名“Millipore”（米国、マサチューセッツ州、ベッドフォード、ミリポア社製）で市販されており、その孔の大きさは 0.45μ である。

ば径が 2μ より小さい、特に 0.5μ より小さい微小点は最大数の抗原及び（または）免疫グロブリンを二次元の領域または配列で詰め込むために最も適している；例えば幅が約 2μ 以下、例えば 1μ の線は結果を容易に判別することができるか、またはある種の機械的な走査装置により定量することができるので抗原数または抗体数が一層制限されている場合に最も適している。平行な線状の配列は次に試験システムの大量生産にかなう多くの細片（strips）にある程度まで切断される。

血清の抗体分析のための本発明による代表的な試験装置は例えば添付図面に示す形態のものであり、その図面は分析する種々の血清中に浸漬後展開され、基質と呈色反応することのできる酵素に結合したインジケータ抗体との反応により可視化された点を示す。スタンダード1-3は適当な希釈液中の正常なヒト血清である。この型の装置は“多重パラメーター抗体”分析を行うのに役立つ。固体多孔性支持体上に施された単一の抗原を有するキットのケースはモノクローン抗体を作る交雑腫

抗原または免疫グロブリンは前記の固体支持体に直接接触させて適用される。直接接触とは任意の機械または手による移送、例えば毛細管またはピペットまたは注射器を用いるか、またはスプレーのような液体あるいは気体発射薬によつて、例えば適当な方向性のある空気流または気体流によるか、またはマイクロエレクトロニクスで通常実施されている石版印刷等を用いる方法により小型化されたテンプレート（型板）またはアプリケーションによるか、または高速電子印刷におけるような“チャージドドロップ”（charged drop）推進力による移送を意味する。試料は適当な幾何図形、即ち形成される吸着領域が点（dots）、はん点（spots）または線の形態、または適当な任意の他の配置を与えるように適用される。その配列は多数の抗原を含むものでも、または少数、または単一の抗原を含むものでもよい。抗原性液体または血清は少量、例えば 1μ より小さい、特に 0.1μ 以下の分別量を適当するのが好ましい。このようにして微小点が多孔性表面に得られる。例え

場のスクリーニングのために特に重要である。

新しいキットのシステムは、所望数の抗原、または抗原の組合せ、または免疫グロブリンを単一の試験法に組み込んで、単一の操作で分析することができるので、制限や限定なくプログラムすることができる。更にこの発明は例えば通常固有ではあるが、病理学上の状況により変わり得る抗体の濃度を監視するために、または病理学上の状況でのみ見出される抗体を検出して定量するために用いられる。支持体の多孔性材料としてニトロセルロースを、好ましくはシート状で用いる場合には驚くほどシステムの分析力が高い。試料をマイクロ毛細管で適用すると、ドットはきわめて小さく、ミリメートル以下の範囲になり、そのドットはその後の処理及び反応中広がりはいらない。そのような微少点状の抗原シートはヒト血清中の極めて広い範囲の抗体の検出と定量に用いることができる。

固体多孔性支持体の上に選択された抗原及び（または）所望により免疫グロブリンを上述のよ

うにしていつたん施すと直ちに、その装置は免疫検定に使用する前に多孔性材料の過剰な結合場所を封鎖するために、更に処理する必要がある。この処理は抗原または免疫グロブリン配列を含む固体支持体を非特異蛋白質によりまたはそのような蛋白質の混合物により、または全血清により、またはこれらの成分のみを任意に組合せるか、その後の免疫検定段階の成分と一緒に合せてインキュベーションすることにより行われる。唯一の制限は前記の蛋白質が免疫検定において抗体または抗原それぞれを妨げたり、それらと交差反応してはならないこと、及び勿論その蛋白質は支持体上に施された蛋白質と異なるものであることである。この残留吸着場所の封鎖は段階的に行うこともできる。従つて予備的段階においては、固定された抗原または抗体を含む支持体をウシ血清アルブミンによりインキュベートすることができる。そのような蛋白質は生理食塩水で希釈すると都合がよく、アセンブリーをそれらの蛋白質で、好ましくは少し温度を上げて、例えば30℃～50℃、好

ましくは40℃でインキュベートし、生理食塩水で洗浄する。この予備的な処理後には、まだ完全には封鎖されていない蛋白結合場所が存在する可能性があるが、これも免疫検定を実施する時には封鎖しなければならない。もし結合場所の残存が非特異蛋白質の交換による背景部の吸着があると、第一の抗血清によるインキュベーション及び同一の非特異蛋白質の継続的な存在下での、更には試験抗体種以外の種(species)から導かれるキャリアとしての全血清の存在下でのインジケータ抗体によるインキュベーションを行うことにより、それが妨げられる。これらの蛋白質混合物が継続的に存在すると両者は残存結合場所を封鎖し、抗体の非特異場所に予め結合した蛋白質による交換または免疫グロブリンによるあらゆる種類の非特異的相互作用を、競争によつて妨げようとする。従つて用いられるキャリア血清はインジケータ抗体と交差反応する免疫グロブリンを含む種からのものであつてはならない。

抗体を検出するための免疫分析の場合には、上

述のようにして調製される装置は、例えば予想される抗体濃度、すなわち通常は封鎖溶液中で1:100～1:10000の範囲の濃度に従つて希釈された分析する抗血清により、例えば2時間から一夜室温でインキュベートし、次いで生理食塩水で十分に洗浄して過剰の未結合の抗体を除去する。インジケータ抗体は、放射能で標識化されるか、螢光性であるか、冷光性であるか、または螢光性物質と結合されているか、またはその基質と呈色反応を起すことのできる酵素と結合されている。インジケータ抗体は通常上記に挙げた封鎖溶液の混合物中で約1000倍に希釈され、例えば2時間インキュベートされ、再び生理食塩水で洗浄される。

これらの方法はそれ自体公知の方法によりブドウ状球菌蛋白質A(staphylococcal protein A)を含む公知のインジケータを用いて実施される。従つて、例えば¹²⁵Iで標識化された免疫グロブリンはオートラジオグラフ法において用いることができ、螢光発光と結合された免疫グロブリンは

フルオロメトリ法で、またワサビダイコン(horseradish)ペルオキシダーゼと結合された免疫グロブリンは呈色反応を引出すためのペルオキシダーゼの基質としての過酸化水素の存在下で、-ジアニジンをを用いて酵素免疫法で用いることができ、呈色反応生成物は不溶性で形成場所に動かずにとどまる。

患者のあらゆる種類の抗体含有液、例えば血清、血漿、脳脊髄液、初乳、リンパ液、乳、唾液、尿、糞便等は本発明の新しいキットにより分析することができる。

多孔性支持体上の抗原の検出は、上述のように適当なインジケータ抗体により、または補体系の成分により、または抗原-抗体反応に敏感な結合酵素系により行うことができる。この指示薬抗体は、ヒトまたは動物の免疫グロブリンと特異的に反応する任意の抗体であるか、またはIgG, IgM, IgA, IgDのような所望の一つの抗体クラス(antibody class)とのみ反応するクラス特異抗体(class specific antibodies)であるか、

またはそのような特異免疫グロブリンの所望の組合せである。IgM抗体は最近あるいは現在の感染であるアレルギーのIgEの特徴を示すために特に興味深いものである。

インジケータ抗体と結合される酵素は、使用時には放射性、蛍光性、冷光性生成物または可視或いは視外領域に特性吸収または反射スペクトルを持つ生成物を形成することによつて局在化し、定量できるようなものであり、唯一の要件は検出試薬または反応生成物が抗原-抗体コンプレックスの場所に局在化して残ることである。補体を結合抗原-抗体コンプレックスの検出に用いる場合には、補体それ自身を上記のいずれかの方法で標識化することができ、または上記のいずれかの方法で標識化した特異抗-補体抗体により順次検出することができる。

本発明の装置は直接抗原を適用した後に得られるような、例えばニトロセルロース等の固体多孔性支持体の形態である。このような装置は乾燥され、もし脱水した状態で保持するならば室温でい

つまでも貯蔵することができる。しかし、本発明の装置は残留吸着容量を封鎖するための蛋白質により、一段階または多段階でインキュベーションした後に得られるような形態のものが好ましい。また、この場合には支持体は乾燥すると、湿気から保護するならば前記の温度でいつまでも保管することができ、このような形態は商業上特に重要である。

免疫検定に本発明の装置を用いる方法においては、非特異蛋白質で処理した後抗原及び(または)免疫グロブリンを含む支持体(第二の装置)を分析する液体、例えば動物またはヒトの患者または日常的なヘルスクエアをうける人の血清や血漿中に浸漬し、次いで分析する液体状の動物種の免疫グロブリン例えば酵素反応生成物が不溶性である酵素結合抗体のような抗-ヒト免疫グロブリンに対向するインジケータ抗体の希釈された溶液または懸濁液中に浸す。最終工程は結合した第二抗体を可視化するものであり、好ましい反応は4-クロロ-1-ナフトールの酸化による不溶性着色物の

生成反応である。最終の工程は医者が個人的に使用して実施できるほど十分に簡単なものであり、またすみやかなものである(全体の操作は3時間以内で実施することができる。)

場合によつては抗原の適用後多孔性支持体を十分乾燥することが得策であるか、または必要である。この支持体は室温で最小1時間好ましくは風乾することができる。焼成は核酸類の場合に必要なが、他の抗原については随意に行うことができ、これにより有害な影響を受けることはない。従つて本発明の一つの特色では、抗原を直接適用して得られるキットが、更に処理を施す前に、特に核酸の抗原がプログラムの一部として含まれている場合に焼成される。焼成は約60℃〜約120℃、好ましくは約80℃の温度範囲で約5分〜約12時間、例えば1時間行うのが好都合である。変性された核酸がそのような条件下でニトロセルロースに結合することが当該技術から知られている。天然のDNAが前記の条件下で結合することも、任意の核酸が結合されて残り抗体分析の条件下で

滅成されないことも予想することはできなかつたことである。

本発明のキットによる免疫検定を実施する基本的操作は以下のとおりである: 装置は上述のように固体支持体に抗原を適用することによつて組立てられる。基本的に2つの異形がある。一つは“単一ドット法”であつて、この方法は抗原を1つだけ適用して試料について対応する抗体の存在をスクリーニングするのに用いられ、他の方法は“多重ドット法”であつて1以上の抗原を適用して1以上の抗体を試験するものである。“多重ドット法”においては、多孔性支持体、例えばニトロセルロースシート上の抗原の配列は既に指摘したように一次元状でも二次元状でもよい。最終の配列が一次元状のものである場合には、試料は一組の平行線として適用され、例えば全免疫グロブリンの既知濃度の内部標準が同じようにして適用される。

支持体の残留結合容量は支持体例えばシートを緩衝塩溶液に“封鎖溶液”(例えば10%のウマ血清)を加えたものの中に、例えば40℃で2時

間浸し、次に乾燥して封鎖される。試験用支持体はこの状態で乾燥して、または例えば抗原のラインに対して垂直な個々の試験用細片を切離した後に貯蔵して送り出される。この細片は実用的な程度の細さにできるが、巾が3 mm以上であつてはならない。実際の試験では全ての試薬は適当な分別量の凍結乾燥状態で容易に貯蔵し、試験のために元に戻すことができる。調査する血清は封鎖溶液を含む塩水で適当に希釈される。希釈率1:100, 1:1000及び1:10000が通常用いられる。細片は、例えばオートメーション化した微量滴定濃度溶液装置(microtiter dilution equipments)のために用意されているような使いすてのできる挿入容器(well insert)、すなわち例えば微量滴定濃度プレートの容器に等しい多数の試料を同時に適用するための貯蔵器として用いられる装置等の中にある1つの希釈溶液中に浸される。個々の容器は通常長さ10 cm、巾4 mm、深さ1 cmである。細片はこの希釈溶液中で例えば2時間〜一夜室温で緩和に攪拌しながらインキュベートされる。

ることによつて、デンシトリー装置を用いて直接読取ることができる。薄層クロマトグラムで着色濃度を測定するために用いられるような装置が後者の目的に適しており、同じ装置は蛍光発光強度をも測定することができる。インジケータ抗体が蛍光性標識を有するか酵素の蛍光性基質である場合にも、そのような装置により定量することができる。

タイター(滴定濃度)が、例えば正常なヒト血清または純粋なヒト免疫グロブリンの内部標準で目盛づけされたものを用いて測定される場合には、そのユニットは特異抗体種の形態の全免疫グロブリンのフラクションであるか、またはオリジナル血清の単位容積あたりのマスキュニットのような抗体の単一濃縮物である。このユニットは異なる個体からの血清または血漿を比較する上で、広い有用性をもち、また異なる検定システムを用いる場合にも有用である。

本発明による免疫検定を実施する、更に詳しく好ましい方法を、発明の範囲を限定することなく

過剰の血清を次に緩衝塩溶液で例えば3回充分洗うことにより洗浄する。洗浄の時期は重要ではない。次にインジケータ抗体の試料を加える。これは通常ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗〜ヒトIgG(H鎖+L鎖)であり、処理は2時間つづけられる。希釈も一般に同一の封鎖溶液で行われる。インジケータ抗体を次に同じ手順により、例えば10分間3回充分に洗い出す。インジケータ抗体を次に、蛍光発光、オートラジオグラフィまたは結合酵素に対する適当な基質のような適当な方法により可視化する。ペルオキシダーゼの場合には基質は過酸化水素の存在下での。-ジアニシジンまたはクロロナフトールでよい。呈色反応を次に例えば30分間〜2時間展開させる。個々の抗体の滴定濃度(タイター、titers)が次いで元の血清の最良の希釈率を選び、標準のものと着色濃度を比較することによつて読み取られる。着色濃度はまた細片を適当な屈折率の媒体中に浸してそれを透明にして透過率を読取るか、または反射強度を測定するように設計された装置を用いるかす

以下に記載する。

A) 単ドット法(Single dot method):

(1) シートの調製

長方形の格子(グリッド)を各辺が4 mm以下のニトロセルロースのシート上につけるか、または3×3 mmのグリッドを前以つてプリントしたニトロセルロース(Millipore社製)を使用する。このシートを蒸留水で5分間洗浄し、室温に放置して乾燥する。その後の処理では、シートを先が丸いピンセットで取扱う。洗浄は常に必要とは限らない。

(2) ドツティング(点描、dotting)

フィルターが乾燥した後、抗原溶液の点滴を各四角辺のシートにのせる。その濃度は抗原によつて異なる。コンプレックス抗原では0.1〜1.0 mg/mlが適当であるが、コンプレックスのより少ない混合物ではそれに応じて濃度を下げることができる。乾燥すると結合が安定化するので、この段階でフィルターを十分乾燥することが有利な場合が多い。核酸の結合は80℃で

2時間必要である。抗原をドツティングしたシートは活性を失うことなく室温でいつまでも乾燥して貯蔵される。ドツトはできるだけ小さい方がよい。20 μ Lのドツティングにはマイクロピペッティング装置が便利であり、また5 μ L Drummondのマイクロディスペンサーが0.5 μ Lをドツティングするのに用いられ、更にHamiltonの注射器が0.1 μ Lをドツティングするのに用いられる。抗原が非常に希薄である場合には、同一場所に連続的に投与して適用してもよいが、フィルターは各適用間時に乾燥する注意が必要である。このフィルターは次にTBS（すなわち、0.15～0.2M NaCl、0.01～0.05M トリス-HCl、pH 7.4～7.8）中で洗浄する。個々の四角形シートはニトロセルロースがまだ湿っている間か、または乾燥状態で裁断することができる。湿時には外科用のメスで裁断され、または裏打の紙がある場合（これは裁断中にひび割れするのを防ぐ）にはその紙も一緒にハサミにより裁断される。四角形のシートは96容

器のマイクロ滴定濃度血（Costar Inc. ケンブリッジ、マサチューセッツ州）の容器内で上に向けて置かれる。

(3) 封鎖 (Blocking)

各容器にはウシの血清アルブミン、全血清または任意の組成物からなる150 μ Lの封鎖溶液を加える。（ウシの血清アルブミンは3%であり、ウサギ、ウマまたはヤギの全血清は1～10%である。）しばしば封鎖システムを56℃で30分間加熱して補体を分離することが必要である。封鎖は室温～40℃で15分間～2時間行われる。このようにして調製されたフィルターも活性を失わずにいつまでも貯えることができる。

(4) 一次インキュベーション (Primary incubation)

封鎖溶液は吸引ラインに取付けられた例えばパスツールのピペットのようピペットにより吸出され、抗体試験溶液（一次抗体）が加えられる。1容器あたり150 μ Lで確かに十分であ

るが、半分の量でも足りるであろう。インキュベーションの時間は抗体によつて異なる。多くの場合には2～4時間で十分であるが、一晚のインキュベーションで10倍以上の感度が得られる。抗体の希釈液は封鎖溶液中で作るべきである。

(5) 洗浄 (wash)

試験抗体溶液は容器から、例えば注ぎ出して除去され、支持体は少なくとも4回、好ましくはTBS溶液を用いて洗浄される。洗浄時間は数分から数時間の任意である。

(6) 二次インキュベーション (Secondary incubation)

支持体は、例えばワサビダイコン (horseradish) ペルオキシダーゼ結合抗-一次スピーシーズ免疫グロブリン100～150 μ L中で、室温にて緩やかに振盪しながらインキュベートする。ここで“一次スピーシーズ”は試験する抗体のものである。例えば、一次抗体がマウスで育成された場合には、オランダ、Tilburg、の

Nordic Laboratories等のペルオキシダーゼ結合ヤギ抗-マウスIgG、またはデンマーク、CopenhagenのDAKO等からのウサギ抗-マウスIgGが用いられる。ウサギまたはヒト血清が分析される場合にも、例えば上述の会社からの相当する二次（インジケータ）抗体を用いることができる。抗体の特異クラスを検出するためには、これも上記の北欧の会社等から得られるIgG, IgA, IgM, IgD, IgEに特異的なクラス特異二次抗体を使用することができる。抗体液（好ましくは封鎖溶液中で用いられるが、他の希釈液をも用いることができる。）の濃度は抗体のパッチにより変わるが、封鎖中の抗体液1/1000が好ましい。

(7) (5)に記載した洗浄が、ここで第二の抗体を除去するために繰返される。

(8) 展開 (Development)

4-クロロ-1-ナフトール (Mereb社製)、o-ジアニジンまたは3,3'-ジアミノベンジジンを経ルオキシダーゼの発色性基質として

用いることができる。4-クロロ-1-ナフトールがメタノール中で3mg/mlの貯蔵溶液として調製されるが、この溶液は暗所で冷蔵して1週間貯えられる。使用直前に、この溶液はTBSの5-30容量により希釈され、 H_2O_2 (通常30%水溶液として入手可能) については0.01-0.03%に作られる。約100-150 μ Lの展開溶液が各容器毎に必要である。陽性の呈色反応は2分後に現れはじめ、2時間後にはそれ以上の色の展開はみられない。反応が完了した後、支持体を蒸留水または水道水で洗浄する。

(9) 貯蔵 (Storage)

ニトロセルロースのシートを、好ましくは湿っている間に写真のマウンティングに用いられるゴムセメントを用いてマウントすることができる。乾燥後は暗所に貯蔵する必要がある。

B) 多重ドット法 (Multiple dot method):

以下のように変更して同じステップを行う: 抗原をグリッド上で平行な列で適用し、封鎖は裁断前にシート全体について行う、シートを簡単に洗

淨し、乾燥し、その状態で貯蔵する。使用前にシートをTBSで再び湿らせ、抗原の列に直角に適當な数の細片に切断して、各細片が各抗原の1つを含むようにする。その細片をDynatech (Alexandria, ヴァージニア州) により製造されたプラスチック皿の種、すなわち“使いすてできる貯蔵器挿入物”中の血清希釈液1-1.5mlの中に入れる。これらは微量滴定濃度プレート (microtiter plates) 及び多重ピペッティング装置 (例えば、Finpipette Multichannel Pipette) と同一の寸法を持つ。皿は同時に8または12の試料を希釈するために使うことができる。8チャンネルインサートに対しては32までの異なる抗原が長さ10cmのニトロセルロース細片上で用いられる。洗浄については、液体をまず皿から注ぎ出し、残りを除去する。洗浄液は洗浄ピンで種を充たすことにより適用される。二次抗体についても1-1.5ml用いられる。

C) 定量

定量は純粋の免疫グロブリンの内部標準のシリ

ーズを用いるか、既知量の全免疫グロブリンを含む全血清を用いて行われる。着色度は肉眼によつて標準の着色度と比べるか、または走査装置を用いて定量される。反射率の測定は薄層クロマトグラフィーの走査器を用いて行われ、動的な30の範囲 (a dynamic range of three decades) で正確な定量が行われる。

元の血清中の抗体濃度は免疫グロブリン量との関係を示す標準曲線から計算される。

本発明の抗体分析法はインジケータ抗体として上に挙げたものを用い、かつその他の条件が規準化されている場合には再現性の高い呈色反応を示す。呈色反応は血清または血漿が適当に希釈される場合には抗体滴定濃度の定量的な尺度である。更に、例えば純粋のヒトIgGの標準化量を、非特異的な場所が上記の方法におつて封鎖される前に微少多孔性支持体に適用することによつて、ヒト免疫グロブリン濃度の内部標準シリーズを採用することにより分析は定量化される。これにより試験後標準着色シリーズが得られ、未知の血清や血

漿によるか、または他の原因によるいかなる変動をも自動的に補償する。変動の発生源の1つは、個々の血清が非特異的結合場所を封鎖するのに用いる蛋白質に対して背景部で異なる結合反応をすることか、または封鎖の処置を回避する微細多孔性シート上の非特異的場所と背景部で異なる結合反応をすることである。この背景は理由はわからないが個々の血清により異なり、それ自体診断上有用である。しかし、スポット状で適用された抗原の存在により抗体の存在の有無を直接感度よく肉眼で測定することができる。

このように微少な差異を、例えば異なる容器にあるよく似た試料を比較するような微量滴定濃度板の使用に依存している通常の酵素-結合抗体検定において肉眼でみることは困難である。微細多孔性シート上の背景部の上に抗原を物理的に並置したために、そうしない場合には肉眼でも分光光度法でも測定することが不可能な重要な差異を検知することができることは全く予想外である。

上述の定量的な呈色反応と内部標準の使用とに

より個々の抗体の滴定濃度(タイター)の定量的測定に器械を用いることができるようになる。このことは電気泳動分析やクロマトグラム分析に通常用いられているような任意のデンストメータにより行うことができる。光学密度は、着色した反応生成物も、また微少多孔性シートをも溶かさないう適当な屈折率を有する溶媒に浸すことによつて微少多孔性シートを透明にして測定することができる。放射能のシンチレーションカウンティングにおける用途からトルエンがこのようにしてニトロセルロースを透明にすることが良く知られている。實際上、トルエンもキシレンもまたグリセリン-水混合物も、 α -ジアニジン酸化生成物の色を溶解せずに支持体を透明にする。更に、抗体滴定濃度に対する定量的な応答は抗原を飽和する濃度の1000倍以下の範囲内の抗体により得られる。詳細な希釈シリーズは従つて必要でなく、本発明は日常的な使用に極めて適したものになる。

ある種の疾患、特に慢性感染症においては、反応性が未知の、一定クラスの抗体の不均一個体群

濃度が大きく増大することが知られている。これらはポリクローン性ガンモパシイ(gammopathy)と呼ばれている。多数の無差別に選ばれた抗原を持つそのような患者の血清または血漿の試験によりそのような疾患の診断が促進される。

例えば、伝染性単核症患者の血清は用いた17の抗原のうち、対照(コントロール)抗原に対するものをも含む10の抗原に対して、予想に反して高い抗体滴定濃度を示す(例3参照)。特に高いのはハシカウイルスに対する抗体滴定濃度であり、このハシカウイルスは抗原的には無関係であり、全体的に無関係なウイルスによる感染に基づく伝染性単核症の病因とは関係があることは以前には述べられていないものである。この滴定濃度は商業的にハシカに陽性なヒト血清コントロールとして入手できる血清中よりも幾分高いものである。ハシカウイルスに対するこの予想外に高い滴定濃度の発見は伝染性単核症の診断に有用である。更に、詳細な抗体のプロフィールはポリクローン性ガンモパシイ(gammopathy)によりもたらされ

る病気の診断のための重要な新しい手段となるであろう。

本発明による上述の装置は抗体分析に対する用途に限定されない：これらの装置は、天然に存在する巨大分子状の動物または植物組織の有機物質、例えば天然に存在するか、人工的に作られる蛋白質、天然に存在する蛋白質結合物(グリセロ蛋白質、リポ蛋白質または蛋白質-核酸コンプレックス等)を含む生化学及び免疫学において、前述のように多孔性固体支持体に適用することができる。限りは分析的特性の目的に適い得るものである。免疫グロブリンは前記の支持体にも結合するであろうが、このことが前述の試験において、非特異的な背景部結合を免疫学的検定を実施する前に除く必要があることの理由である。リボ核酸及びデオキシリボ核酸は本発明の新しいキットによる検定にも使用することができ、後者は自己免疫病を試験するプログラムに含める場合に特に重要なものである。

本発明による装置は、またリユーマチ因子及び

循環免疫コンプレックスの検出にも適している。このような免疫グロブリンまたは抗原-免疫グロブリンコンプレックスは、慢性炎症の状態にある患者、特に結合組織病の患者の血清にしばしば認められる。リユーマチ因子の場合には、ウサギ等の動物スピーシーズのIgGを、上述のようにして封鎖溶液によりインキュベートし、次いでヒト血清等の分析する血清によりインキュベートしたニトロセルロース等の多孔性支持体に適用する。リユーマチ因子はキット上のIgGに結合し、形成されたコンプレックス及び結合されたリユーマチ因子は、分析する血清スピーシーズに対向するインジケータ抗体によつて認識することができ、例えばウサギ-抗-ヒト等の抗-ヒト抗体である。インジケータ抗体は、通常適当な基質と着色反応生成物を形成しつつ酵素に結合する。ヒト抗-リユーマチ因子のようにスピーシーズに特異的でないリユーマチ因子を検出すべくセットする場合には、封鎖溶液中に存在するウマ等の他のスピーシーズの大過剰のIgGによつてスピーシーズに特異

的でない抗体のクラスが競争反応を起してしまうことが予想された。しかし驚くべきことに、このようなことは起らない。

免疫-コンプレックス検定の場合には、蛋白質CZqはニトロセルロースに施したときにも特異的に抗原-抗体コンプレックスに結合する能力を維持する。このことはその蛋白質がよく知られているように不安定であることからみて極めて驚くべきことである。それは支持体上で乾燥された状態では室温において安定性である。

本発明の新しいキットにより、例えば免疫検定を実施するのに使用することのできる抗原のグループは極めて広範囲のものであり、例えばヒト生検物質、哺乳動物の組織または細胞、体液、マイコプラズマ、後生動物寄生体、菌類、バクテリア、原生動物、ウイルス、またはこれらのものから誘導される標品が挙げられる。例に説明した抗原は別として、下記に挙げるものが本発明において使用するのに適当である：ウイルスまたはそれから調製される抗原類：インフルエンザ菌株 (influenza strains)、これにはA, A, A₂, B, Cが含まれる、パラインフルエンザ菌株1, 2又は3、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (lymphocytic choriomeningitis virus)、流行性耳下腺炎 (Mumps)、Q熱リケツチア (Q fever Rickettsia)、狂犬病 (Rabies)、呼吸系多核性ウイルス (Respiratory syncytial virus)、ロクウイルス (Rotavirus)、風疹 (Rubella)、アデノウイルス (Adenovirus)、エプスタイン・バル・ウイルス (Epstein Barr virus)、ブルセラ (Brucella)、ヘパティティスB (Hepatitis B)、コクサツキ (Cochsackie) B1-B6, A9、ポリオ (Polio) 1, 2または3、レオ (Reo)、エコ (Echo) 1-33；菌類の抗原：ヒストプラスモサ・カプスラタム (Histoplasma capsulatum)、コエシデオイデス・イミテイス (Coccidioides immitis)、ブラストマイセス・デルミティティス (Blastomyces dermatitidis)、アスペルギルス・フミガタス (Aspergillus fumigatus)、フラバス (flavus) またはカルネア (carnea)；

後生動物抗原：エンテメバ・ヒストリテイカ (Entamoeba histolytica)、トリパノソマ・クルチ (Trypanosoma cruzi)、エキノコツカス・グヌロシス (Echinococcus granulosus)、シストゾマ・マンソニ (Schistosoma mansoni)；バクテリア抗原：スピロヘート・ライター (Spirochetes reiter)、トレポネマ・パリダム (Treponema pallidum)、エスキリチア・コリ (Escherichia coli)、レプトスピラ (Leptospira)、リステリア (Listeria)、サルモネラ (Salmonella)、シゲラ (Shigella)、ブドウ状球菌 (Staphylococci)、連鎖状球菌 (Streptococci)、レギオネラ・ニューモフィラ (Legionella pneumophila)；自己-抗原：核RNP、補体フラクシオン、ヒト血清蛋白質、リウマチ因子、インシュリン、インシュリン受容体、甲状腺刺激ホルモン受容体、アセチルコリン受容体及びその他のホルモンまたは受容体；その他全ての抗原類、すなわちイネ科 (Gramineae) の抗原、例えばダクタイリス・グロメラタ (Dactylis glomerata)、プエストウカ・

エラテイオア (Festuca elatior)、ロリウム・ペレネ (Lolium perenne)、フリウム・プラテンシス (Phleum pratense)、ポア・プラテンシス (Poa pratensis)、アグリステイス・ストロニフエラ (Agrostis stolonifera)、セカーレ・シアリアル (Secale cereale) 等、薬用植物類の抗原、例えばアルテミシア・ウルカリス (Artemisia vulgaris)、クリサンテマル・ロイカンテマム (Chrysanthemum leucanthemum)、ケノボデウム・アルバム (Chenopodium album)、タラキサム・ブルガレ (Taraxacum vulgare)、ソリダゴ・バガウレア (Solidago virgaurea)、アンブロシア・トリフィダ (Ambrosia trifida) 等、樹木類の抗原、例えばオレア・ヨーロッパ (Olea europaea)、ユガランス・カリホルニカ (Juglans californica)、ウルマス・アメリカナ (Ulmus americana)、コリラス・アビラーナ (Corylus avellana)、プラタナス・アセリホリア (Platanus acerifolia) 等、菌類例えばペニシリウム・ノタタム (Penicillium notatum)、クラドスポ

リウム・ヘルバラム (*Cladosporium Perbarum*)、アスペルギラス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*)、動物類の上皮 (*animala epithelia*) 例えばネコ、ウマ、ウシ、イヌまたはギアナブクの上皮等、食物の抗原例えばミルク、麦、アーモンド、カニ、クレベツト (*crevettes*) 等、チーズダニ (*mites*) の抗原、塵埃 (*Dust*) の抗原、昆虫類例えばミツバチやスズメバチの抗原及び医薬例例えばペニシリン G、ペニシリン V、シナクセン (*synacthen*)、ステロイドの抗原等。

免疫学上の操作は、また特殊な薬剤を検出し、監視する場合にも極めて重要である。例えば疾患の処置の過程においてモノクローン性抗体の使用をベースとするこのような試験は特異抗体を多孔性支持体に適用し、上述の原理に従つて免疫検定の逆の操作により特異抗原を検出し、定量するものである。特異的に抗原-抗体錯体に結合する補体蛋白質の性質は、ここに記載したようなキットにおいて、特異抗原、例えば薬剤その他の薬理学上の試薬、またはホルモンのような特異抗原、ま

たはそのような抗原類の任意の組合せを直接または間接的に可視化して定量するために用いることができる。従つて本発明は、相当する特異性又はモノクローン性抗体を本発明の固体支持体に適用し、例えば補体 C₂q 等の補体によるか、または抗体-抗原相互作用に組合された酵素反応により抗原-抗体コンプレックスを検出することによつて、あらゆる種類の抗原、例えば薬剤及びホルモンをも分析する免疫学上の方法を含むものである。診断のために生物学上の液体中の特殊薬剤やホルモン類を監視することは、いわゆる“均一抗体検システム” (*Homogeneous antibody assay systems*) (Syva 社 (カリホルニア) の商標 EMIT) によつて近年促進されている。この分析システムでは他の免疫検定システムで必要とされる十分な洗浄の必要性はなく、その結果操作は簡単で、かつ迅速になる。均一抗体検定は、問題にする薬剤またはホルモン、及びその薬剤またはホルモン分子と信号分子とのアダクトに対して特異的な抗体を使用することに依存している。信号分子アダクトは副

定し得る信号が特異抗体に結合したときに発生しないアダクトである。後者の結合が問題にする薬剤やホルモンの存在によつて禁止されるとき、生物学上の液体中にある薬剤やホルモンに関連する陽性の信号が生ずる。信号分子はインジケータ酵素自体、またはインジケータ酵素、或いは測定し得る信号中に生ずる酵素の結合シリーズに対する、基質、共因子または補欠分子団である。

D.L.Morris, P.B.Ellis, R.J.Carrico, F.M.Yeager, H.R.Schroeder, J.P.Albarella, R.C.Bogulaski, W.E.Hornby 及び R.Dawson による *Journal "Analytical Chemistry"* 53 巻, 658-665 頁 (1981 年) の「ホモジニアス比色免疫分析における標識としてのフラビンアデニンジニクレオチド」 (*Flavin Adenin Dinucleotide as a Label in Homogeneous Colorimetric Immunoassays*) という標題の最近の文献には、分析する分子 (*Analyte*) が酵素グルコースオキシダーゼの補欠分子団であるフラビンアデニンヌクレオチドアダクトに共有結合される方法が記載されてい

る。特異抗体に結合したときには、分析する分子 (*Analyte*) とフラビンアデニンヌクレオチドとのアダクトはグルコースオキシダーゼを活性化することはできない。アダクトが分析する分子の存在によつて特異抗体に対する結合を妨げられるとグルコースオキシダーゼは活性化される。そしてこの活性化は未知の薬剤またはホルモンの量に関係する。活性化されたグルコースオキシダーゼは反応生成物として H₂O₂ を生じ、この H₂O₂ はペルオキシダーゼに対する基質であり、発色性物質と共に用いて呈色反応を起こすことができる。

均一抗体検定システムは本発明の方法により固体支持体上で用いるように容易に適応させることができる。特異抗体及び信号システムの巨大分子成分、例えばグルコースオキシダーゼやワサビダイコンペルオキシダーゼは所望の配置、好ましくは同一場所で、固体多孔性支持体上に直接適用して施すことができる。そこで結合酵素反応は物理学的合致法 (*physical coincidence*) からの利益を受けることができるであろう。本発明方法によ

れば多数の抗体と信号システムのインジケータ酵素とを同一の支持体上に施して同時に多重抗原検定を容易に行うことができる。このアプローチは例えば薬剤誤用分析キット (drug abuse assay kit) や特異的バクテリア抗原同定キットにおいて大きな用途があるであろう。

この発明は例えば免疫学の分野で分析のために使用される新しい装置を作ること及び上述のように免疫分析にそのような装置を使用することを目的にする限り、そのようなプロセスの単一の各工程をも含むものである。

更にこの発明は、固体支持体の形態の上記装置に加えて、血及び分析において固体支持体を処理するのに必要な道具類、並びに乾燥状態で調製された試薬類例えば予め量を測定したキャリア血清インジケータ抗体、ペルオキシダーゼ基質等からなるキットにも簡係するものである。そのようなキットは例えばニトロセルロースシートまたは細片の形態の本発明の装置と上記の任意の付属品とを含む装置の形のものである。特に血は多数の凹

部があるプラスチック製の皿の形を取ることができ、乾燥試薬はインジケータ抗体、塩類、緩衝剤、キャリア血清または蛋白質の凍結乾燥混合物であり、インジケータ酵素の着色試薬は発色基質例えば4-クロロ-1-ナフトール、塩類、緩衝剤及び予め測定した量の液体物質例えば過酸化水素を入れたアンプルの予め秤量した分別薬である。

この発明は特に検出と定量を計算かオートラジオグラフィによつて行う放射能で標識化したインジケータ抗体からなるか；または検出と定量をフルオリメトリーによつて行う蛍光インジケータと結合されているか；または検出と定量をデンストメトリーまたは肉眼で行う適当な基質との反応で呈色反応することのできる酵素と結合されているか；または抗原-抗体コンプレックスに結合した補体蛋白質をベースとし、その補体は上記の3種の方法のいずれかにより、または別の特異的な抗補体抗体（これも上記の3種の方法のいずれかにより標識化されている。）により標識化されているインジケータ抗体からなるキット及び（または）

装置を含むものである。

更に本発明は特に、下記のa)、b)及びc)、すなわち

- a) 固体支持体が、1以上の特異抗体と、抗原-抗体反応が測定し得る信号を生ずる試薬との配列を含み、信号システムはインジケータ酵素または酵素の結合シリーズのための基質、補因子または補欠分子因からなるか、または抗原と信号分子との共有結合アダクツからなる。酵素または結合酵素システムは固体支持体に対して、特異抗体と一緒に、または別個に適用することができる；しかし支持体には酵素または結合システムを全然適用する必要はないし、溶液の状態で用いてもよい。
- b) 固体支持体上の配列が人または動物の免疫グロブリン、またはそれらのフラグメントをリウマチ因子の検出及び定量のために含む。
- c) 固体支持体上の配列が、特に循環免疫コンプレックスとして知られている循環抗原-抗体コンプレックスの検出及び定量のための補体蛋白

質を含む。

のキット及び（または）装置を含むものである。

本発明は更に、特に人間または動物の病気の診断、監視及び予後の免疫検定法による、特異抗原または特異抗体またはこの両方を検出及び定量するための、及び研究と開発におけるモノクロン及び他の抗体または抗原の検出及び定量のための、並びに未知の抗原を固体支持体に適用して、公知の抗体を用いる免疫検定法により検出と定量を行うための、上述のような全てのキット及び装置に関係するものである。

下記の例は本発明を説明するものである。

例1： ドットサイズの変化

ヒト全血清を直接Millipore（孔のサイズ、 $0.45\mu\text{m}$ ）シートに適用する。その中のIgGはペルオキシダーゼ結合ヤギー抗ヒトIgGにより染色されたものである。適用容量をマイクロドット（microdot）の可能な最小のサイズを決めるために変化させる。正常ヒト血清を、2%ウシ血清アルブミンを含むTBS（ 0.15M NaCl ， 0.02M

Tria - HCL, pH 7.4) 中で 1 : 1000 の容量比に希釈する。この溶液の分別量を次に $3 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ の Millipore 細片上に $0.1 \mu\text{L}$ ずつ変化させてマイクロシリンジ(ハミルトンのマイクロシリンジが好ましい)を用い直接スポットする。シートを次に乾燥し、10% (V/V) ウマ血清を含む TBS に浸して 4.0℃ にて 2 時間インキュベートして Millipore シート上の非特異蛋白質の結合場所を封鎖する。シートを TBS で洗浄し、次いで製造業者 (Nordic Laboratories, Tilburg, オランダ) の仕様書に従って蒸留水に溶解したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗-ヒト IgG $1 \mu\text{L}$ に浸し、10% ウマ血清を含む TBS 中で 1 : 1000 に希釈した。処理は使い捨てのできる 8 種の挿入容器の入れ物 (well) (Dynatech Laboratories, アレグザン

ドリア市、ヴァージニア州、米国) 中で行われる。ペルオキシダーゼ結合抗体によるインキュベーションは室温で 2 時間静かにかきまぜながら行われる。過剰の抗体を TBS で十分に洗浄して除去する。最後に、ペルオキシダーゼ基質混合物を TBS 5 mL 、

30% H_2O_2 水溶液 $1 \mu\text{L}$ 、 α -ジアニジン (1% W/V メタノール中) と調合し、この溶液 1 mL を前記の桶に加える。次に反応を暗所にて 2 時間進める。過剰の試薬を脱イオン水で洗い出し、細片を室温で風乾し、スポットの大きさをバーニア (Vernier) 測径器にて測定し、下記の結果を得る。

血清量	スポットの直径
$0.8 \mu\text{L}$	1.5 mm
$0.6 \mu\text{L}$	1.3 mm
$0.4 \mu\text{L}$	1.0 mm
$0.2 \mu\text{L}$	0.6 mm
$0.1 \mu\text{L}$	0.3 mm

最少点 (マイクロドット) の直径は $0 - 0.2 \mu\text{L}$ の範囲では適用した容量に関して直線性がある。量が多くなると直線性からずれるが、これは適用点における吸着によるものと考えられる。更に、グリッドを有する Millipore シートを以上に広がない程度に疎水性である。マイクロドットシステムの本質的な分析能力は、通常のピペット装置で適

用することができる最小量のサイズ以下、すなわち $< 0.3 \text{ mm}$ で極めて良好である。標準的な長さ 100 mm の、"桶挿入容器" の入れ物に適合させた細片には、ここで用いられているように二次元配列でスポットされた 300 個の抗原を含めることができた。二次元配列のドットを使用する場合には 10 cm の四角辺形は 10³ 個までの試験薬を含むことができる。

例 2 : インフルエンザウイルス抗体の疫学的スクリーニング

標準のインフルエンザウイルス菌株の 1 シリーズを、赤血球凝集反応標準試験に用いるように、Flow Laboratories (ロツクビル市、メリーランド州、米国) から入手する。製造業者から入手できるプリントされたグリッドのある Millipore シート (孔のサイズ $0.45 \mu\text{m}$) の $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 四角辺中にウイルス抗原懸濁物をスポットする。適用した試料は希釈しない物質 $0.5 \mu\text{L}$ である。インフルエンザワクチン (Sandoz "Sandovac" も同様にスポットする。試料は線状の配列でスポットされ、

各線は全く同一のスポット (複数) のみを含み、処理後にシートを裁断して細片とし、各細片は抗原の完全なセットである 1 つのドットを含む。シートを次いでウマ血清により非特異的結合場所を封鎖するために例 1 に記載したようにして処理し、乾燥する。試験装置は乾燥されていると、活性を失うことなく室温でいつまでも貯蔵することができる。血清は約 3 週間前に上記のワクチンにより免疫化した個体から取られたものである。この血清の希釈シリーズは TBS 10% ウマ血清中で作られ、まず 100 倍に希釈され、次いで 5 倍ずつ希釈されたものである。細片のシリーズは上述のようにして試験装置から裁断される。

細片は室温で一夜静かにかきまぜながら血清の希釈液中に浸し、次に TBS で十分に洗浄する。結合された抗体を次いで例 1 で述べたのと全く同様にしてインジケータペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒト IgG により着色する。抗体の滴定濃度 (タイター) を、着色を観察することができる最大希釈液として終点法により記録し、タイターをこの

希釈率 (dilution factor) の逆数として表現する。下記の結果を得る。

試験に用いた抗原	抗体滴定濃度
<u>Sandovac ワクチン (混合物)</u>	
A/ブラジル/11/78	
A/バンコク/1/79	625,000
A/シンガポール/222/79	
<u>Flow 赤血球凝集反応試験抗原</u>	
A/PR-8/34	2,500
A-1/FM-1/47	12,500
A-2/ホンコン/68	<100
A-2/英国/42/72	<100
A-2/日本/170/62	<100
B/Lee/40	500
B/Mass/3/66	500
陰性ウイルスコントロール	<100

この表は個体をワクチン接種した抗原に対しては血清は抗体の非常に高いタイターを持つが、ある種のヒストリカルなインフルエンザ菌株に対しては滴定濃度が著しく変化し、ウイルスを有さな

いコントロール抗原製品に対しては滴定濃度は検出されない。従つて全てのインフルエンザ菌株は単一の操作で個体の血清に対して容易にタイターが決められる。この方法はまた極めて敏感である。高い滴定濃度 (タイター) の抗体については終点は濃度 (C) が 10^{-6} 倍希釈液であり、必要な血清は極めて少量であり；最低の希釈液については媒質 1 ml 中 10 μ l である。この方法は個体検定法に各々抗原を必要とする通常の赤血球凝集抑制試験または補体結合試験よりもすぐれている。細片は結果を永久的に記録し、いつまでも保管することができる。

例 3 : 10 個の前以つて存在する免疫診断キットで構成される装置

装置は例 2 と同様に商業上入手できる抗原をスポットすることにより構成される。下記の抗原を最大の応答が得られるに十分な、希釈率で使用する。抗原は全て TBS 中で希釈する。

抗原に関する記載	使用した希釈液
<u>Behring :</u>	
蛍光性抗体試験キットからのトキソプラズマ	希釈せず
ハシカ (Measles) 赤血球凝集抑制試験	1/25
オルニトシス (Ornithosis) 補体結合試験	希釈せず
単純性疱疹型 (Herpes Simplex type) 1 補体結合試験	1/25
マイコプラズマニューモア (Mycoplasma pneumoniae) 補体結合試験	1/5
チツク-ボーン-エンセファリテス・ウイルス (Tick-borne encephalitis virus) 補体結合試験	希釈せず
水痘-帯状疱疹ウイルス (Varicell Zoster virus) 補体結合試験	1/5
<u>Flow :</u>	
アデノウイルス型 4 ウイルス補体結合試験	1/5
サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus) (Ad 169) ウイルス補体結合試験	1/5
<u>Sandoz :</u>	
Sandovac インフルエンザワクチン	希釈せず

これらの例は診断キットの要素としての陽性コントロールヒト血清の入手のしやすさに基づいて選択されたものである。しかし、最初の例から明ら

かなように 1 試験あたりの抗原の数は所望によりはるかに多い数に増やすことができる。

試料と、入手できる場合には陰性コントロール抗原とが例 2 と同様にプリントされたグリッドを有する Millipore シートにスポットされ、非特異的场所はウマ血清で封鎖され、乾燥されて前述の例と同様に保管される。個々の細片は例 2 のようにシートから裁断され、前記の表に挙げたキットと同様にして陽性及び陰性コントロール抗血清により試験される。血清は全て TBS - 10% ウマ血清中で 1:100 に希釈され、関連の試験細片は例 2 のようにして処理される。このシリーズにおいては、各血清に対する各抗原について結果を陽性 (プラス) または陰性 (マイナス) として記録し、下記の表に総括する。

試験抗原	試験抗血清														
	トキソプラズマ	はしか	オルニトシス	単純性疱疹	単純性疱疹コントロール	マイコプラズマ	マイコプラズマ・コントロール	アデノウイルス	サイトメガロウイルス	サイトメガロウイルス・コントロール	チツク・ボーン・エンセファルテイス	・コントロール	水痘-帯状疱疹	水痘-帯状疱疹コントロール	インフルエンザ
モノヌクレオシス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
モノヌクレオシス・コントロール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
トキソプラズマ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
トキソプラズマ・コントロール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
はしか	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
はしか・コントロール	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
オルニトシス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
単純性疱疹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
マイコプラズマ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アデノウイルス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
サイトメガロウイルス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
チツク・ボーン・エンセファルテイス	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水痘帯状疱疹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

どの場合にも、丸で囲んであるように相当する試験抗血清と試験抗原との組合せについてはスポットは陽性である。

陰性コントロール血清は全て取得されたキット中に供給される抗原に対しては陰性であるが、それぞれは他の種々の抗原に対しては陽性である。陰性コントロール抗原も供給される血清に関しては陰性であるが、しばしば他の血清はそれらの標品に対向する抗体を持つ。本発明の方法では従ってそれを構成しているキットの場合と同じ特異性が得られる。

これらの試験の多くは単純性疱疹 (Herpes simplex)、水痘帯状疱疹 (Varicella zoster) またはアデノウイルスのような固有ウイルスに対する抗体のためのものである。従ってこれらの抗原に対して陽性であるように特異性をもたらさない多くの血清中でそのような固有の抗体を見出すことは驚くべきことではない。實際上、そのような抗体の完全な欠如は個体の免疫防御システムにおける欠陥を示すものであり、問題にしている反応

物によつて極めて感染しやすいことを示すものである。実際には、通常使用されている多くの血清学上の手法に関しては、滴定濃度のみを変えることが現実の感染の診断に有用である。単核症血清は明らかに関係のない広範囲な抗原に対して一定の抗体を有する。はしかウイルスに対する抗体の滴定濃度は特に高い。ある種の陰性コントロール抗原標品に対するものをも含めて、明らかに無関係な抗体の広いスペクトルの出現はポリクローン性ガンモパシイ (gammopathy) を示すものであり、感染性単核症の診断に有用である。

感染性単核症血清のほか、他の数種の血清がインフルエンザコントロール抗原に対し抗体を与える。この説明は純粋でない抗原の最悪の場合についてのものである。インフルエンザ抗原はワクチンとして人間に用いられるように高度に精製されたウイルス標品であるが、これに対しコントロール抗原は卵蛋白質を不純物として含むはるかに精製度の低い標品である。どのようなケースでもこのコントロールに対する抗体の滴定濃度はウイ

ルス抗原に対する滴定濃度よりも常に低い。不純物に対してそのような抗体が存在することは、血清を採取した患者が通常用いられているワクチン標品中の不純物に対してアレルギー性であつたことを示すものである。別の場合としては、その患者が卵にアレルギー性であつたことを示すものかもしれない。實際上、そのような抗体を監視することは、ワクチン、環境及び食料のアレルギーの制御に有用であろう。

アレルギーは通常 IgE 型の循環抗体の存在と関連している。ここに記載したようにペルオキシダーゼ結合ヤギ抗-ヒト IgG のインジケータ抗体による検定により、用いられるヤギ抗体が H 鎖及び L 鎖の双方と反応するので、IgM 及び IgE 抗体が検知される。IgG や IgM、又は例えば IgE に特異的な抗体を用いて、更に特異的な試験を組立てることができる。

例 4: 自己免疫その他の疾患のある患者の血清中の抗体分析

この装置は例 3 で用いたのと同じの抗原により、

の抗原について $0.5 \mu\text{L}$ の分別量を例 3 に記載したようにして、下記の 2 段階で Millipore シート上にスポットする。

1) RNA 及び変性 DNA をニトロセルロースに不可逆的に結合させる公知の操作 (P.S. Thomas, Proc. Nat. Acad. Sci. US 77, 5201-5205 (1980) 参照) に従って、核酸を直接スポットし、 80°C にて 2 時間シートを焼成して結合させる。天然の DNA もこのようにして結合することは以前には知られていなかった。

2) このように処理した Millipore シート上に、残りの他のすべての蛋白質、細胞またはサブ細胞フラクションをスポットする。

次いで先述の例に記載したようにして装置を調製し、自己免疫疾患に苦しむ患者の個々の血清といくつかのコントロールの患者血清とを試験するために細片を裁断する。血清は TBS - 10% ウマ血清中での $1/100$ 、 $1/1000$ 及び $1/10000$ 倍の希釈液で試験し、前例のように処理する。更に、装置は試験における IgG 内部標準として正常ヒト

自己免疫疾患を表示する抗原を加えて構成される。下記に述べるように純粋な変性核酸類、及び典型的な非分化性ヒト細胞系統から採取できかつ容易に多量に培養される、ヘラ細胞より導かれるサブ細胞 (subcellular) フラクシオンが用いられる (ウサギ: Sigma からのもの)。

サケ (鮭) 精子 DNA (Serva、ハイデルベルク) を 1 M グリオキサールの存在下で 100°C にて 2 分間加熱し、次いで急速に冷却して変性する。

エスケリキア・コリ (大腸菌) リボソーム RNA を公知の手順によつて大リボソームサブユニットから調製する (Gordon, Ramjouw, Analytical Biochemistry 83, 763-766 (1977) 参照)。

ヘラ細胞は培養され、サブ細胞フラクション (核、ミトコンドリア、仁、ポリソーム及びサイトソール (cytosol) フラクシオン) は既知の方法によりヘラ細胞から調製される (Penman, S.J. Mol. Biol. 17, 117-125 (1966))。

蛋白質濃度が $1 - 10 \text{ mg/ml}$ の範囲の上記の全て

血清の $0.5 \mu\text{L}$ のスポットを含む。

これらは TBS, 1 mg/ml ウシ血清アルブミンの $1/1000$, $1/2000$, $1/4000$ 及び $1/8000$ 希釈液である。

疾患は American Rheumatological Association の基準によつて診断される。結果を下記の表に総括する。

試 験	正 常		SLE					RA												SLE+RA	MCTD	MS	ICD	AE
	15	17	2	5	7	8	9	1	10	12	14	16	18	19	20	6	11	3	4	13				
天然のDNA					5																			
変性DNA																								
RNA																								
ヘラ細胞			5	5	5	12.5	<1	<1						1	<1									
ミトコンドリア			5					50																
核			5	12.5	5	12.5					<1			1	1									
仁			5		<1						<1						>500							
サイトソール			5		<1												<1	>500						
リボソーム			5															>500						
ミオシン		2			<1					1								>500						
トキソプラズマ		<1	<1	<1	<1		<1	<1	<1			<1	<1		<1		1							
ハシカ	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	5	<1	1	<1	5	<1	1	1			<1						
オルニトシス						<1										<1	<1	<1	<1	<1				
ヘルペス	<1	12.5	2.5			5	1	12.5	<1	10	1	10		2	5	5		12.5	<1					
マイコ・プラズマ	1	1	1											1			<1		<1	<1				
アデノウイルス	10	5	1	<1	1	1	1			2	1	<1	5	1	5	<1	1	5	<1	25				
サイトメガロウイルス	5				1	<1	1							5		2		<1						
水痘	2	10	1	<1	2	1	1	1	12.5		1	1	5	1	1	5	12.5	1	2	10				
インフルエンザ	10	10	1	5	5	12.5	12.5	2	12.5	25	5	10	10	10	1	10	2.5	5	2	2				
コントロール									1								1			<1				

この表では、抗体滴定濃度は正常な個体の血清または表に示した疾患に罹っている個体の血清からのものである。血清は1-20の番号を付されている。滴定濃度は特異抗体 $\times 10^{-3}$ としての全免疫グロブリンのフラクションで表示されている。抗体が意味のある量検出されない場合には、記載はなされていない。意味のある量の抗体があつても標準の範囲外である場合には結果は<1または>500として示されている。

SLE = 全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus)

RA = リウマチ様関節炎 (rheumatoid arthritis)

MCTD = 混合結合組織病 (mixed connective tissue disease)

MS = 複合硬化病 (multiple sclerosis)

ICD = 免疫コンプレックス疾患 (immune complex disease)

AE = アンギオニューロテイク浮腫 (angioneurotic edema)

かなりの数の自己抗体が自己免疫血清に認められる：1例では天然のDNAに対して特異抗体であるが変性DNAとは反応しないものであり、他の例では全細胞、細胞小器官等に対して特異抗体であるものがあり、それから蛋白質のみでなくより広い抗原スペクトルに対して試験が感度を有することが明らかである。200の個体SLE血清の収集において、抗-天然DNA及び抗-変性DNAの滴定濃度は異なる個体間で広範囲に変わり、互に独立していることが認められている。このことは検定が特異的であることを示している。場合によつては血清が既に処置を受けた患者からのものであるために自己免疫抗体がもはや存在しないこともありうる。前に述べたように他の場合には、卵蛋白質に向けられた抗体はしばしばインフルエンザウイルスコントロール中に検出される。

この検定システムは、自己免疫疾患の診断についての既存の方法論よりもすぐれた下記のような利点を有する：関心のある全ての抗体が別個の方法よりもむしろ1つの方法で測定することができ

る。副細胞コンパートメント (subcellular compartments) に対する特異抗体は通常蛍光顕微鏡により測定される。これは退屈なものであり、主観的であり、また長時間を要するが、本発明の方法は簡単であり、自動的に定量することができる。ウサギのアクチンとミオシンは商業的に入手できるために加えられる。この方法がそれらの蛋白質に対する抗体を検出できることは明らかである。しかし、自己免疫疾患を診断するために、それらを相当するヒト蛋白質に置換することが可能であり、また同様にヒトコラーゲンに置換することも可能である。更に、特殊化した蛋白質を作る種々の分化細胞も含むことができるし、またここで用いられている未分化のヘラ細胞をも含むことができる。このキットは、免疫抑制剤による自己免疫疾患の処置の過程で患者を監視するために使用することができるという別の利点を有する。その場合には病理学上の抗体の消失を監視し、固有な良性の抗体の抑制を避けるように処置を制御し、患者の免疫系を全体的に損わないようにすることが

three decade) で抗体を定量でき、結合した抗体量が 0.5 ng 以下で検出できることが表から理解できる。

例 6: 種々のペルオキシダーゼ基質の比較

例 5 の抗体分析を 2 回繰返す: 第 1 の場合には、例 5 と全く同じ操作を行い、第 2 の場合には以下の変更が行われる: TBS 5 ml、H₂O₂ (水中 3.0 % w/w) 10 μ l 及び、 α -ジアニシジンの代わりにメタノール中の 4-クロロ-1-ナフトール 0.3 % w/v (Merck 社) 0.3 ml を用いる。着色感度は等しいが、 α -ジアニシジンは 4-クロロ-1-ナフトールよりもわずかに高い背景濃度を与える。 α -ジアミノベンジジンも同様に用いることができる。4-クロロ-1-ナフトールが発ガン物質であることは知られていないので、商業上それを用いるのが好ましい。

例 7: 神経細胞膜フラクション (neuronal membrane fractions) に対するモノクローン抗体のスクリーニング

交雑腫瘍細胞系統 (hybridoma cell lines) の

できる。

例 5: パラメータが複数の抗体分析の感度の限界

純粋なヒト IgG の標準希釈液シリーズを例 1 のように Millipore シート上にスポットする。次にシートを例 2 で使用したのと同じ血清の 1/100 希釈液を用いて例 2 と全く同じように処理する。

スポットの反射率を Camag 社 (Mettler, スイス) により製作された薄層クロマトグラムスキャナーを用いて定量する。下記の結果が得られる。

ドット中の IgG の量 (ng)	反射率 (任意に定めた単位)
50	54
23.3	49
10.8	41.8
5	37
2.33	22
1.08	14
0.5	10
0.23	7

反射率の測定により結合した抗体量が 30 以上の動的範囲以上 (dynamic range of greater than

調製においては、関心のある特異抗体を作る可能性のある多数のクローンを選別する必要がある。もし複数の別個の抗原に対する抗体についての各クローンを選別することを欲する場合には前述の例の方法論を殆ど変更せずに使用することができる。もし単一の抗原に対する抗体を選別することを望む場合には下記の手法を用いることができる: Millipore シートを 4 mm 以下の四角片にマークするか、または既にプリントされた四角辺を有する、前例で用いたような市販品を入手できる Millipore シートを使用する。予め蒸留水で Millipore シートを洗浄すると有利な場合が多い。ラット脳シナプトソーム原形質膜 (Rat brain synaptosome-plasma membrane (Tones, D.H., Matur, A.I., Biochem. Biophys. Acta 356, 276-287 (1974)) が蛋白質濃度 0.1 - 1 mg/ml の範囲で抗原として用いられる。これらの抗原の標品 0.5 μ l を例 2 に記載したように Millipore シートにスポットする。必要ならば、局部的濃度は適用毎に乾燥しながら同一のスポットに繰返し適用すること

により高めることができる。次にシートをTBSで洗浄し、所望により前例で述べたようにウマ血清の封鎖溶液で処理し、乾燥して保存する。個々の四角片を裁断しCostar皿(ケンブリッジ、マサチューセッツ州、米国)の容器に入れる。各容器を3%ウシ血清アルブミン150 μ L、TBS中1%正常ヤギ血清で室温にて振盪しながら15分間処理する。別の場合として、Milliporeシートが封鎖溶液で処理されたときには容器は別々に被覆することができる。被覆された皿とフィルターはその状態でも保管することができる。

マウスをラット脳シナプトソーム原形質膜標品で免疫化し、脾臓を除去し、骨髓腫細胞で交雑化し、選定した媒質中の200の容器に分けて、公知の方法(G. Köhler, C. Milstein, Nature 256, 495-497(1975))により交雑腫瘍を育成する。

10日後、容器からの上澄液を分別して四角片を含むCostarプレート容器に入れるか(容器1個につき75-150 μ L)、またはそれからの希

モノクローン抗体を例7と同様にして得る。このモノクローン抗体を種々のラット組織からの粗ホモジエネート中のMIT-23抗原の検定に用いる。各例において、ホモジエネートを1.0 μ g/ml量でドット(点描)する。組織としては肝臓、小脳、前脳、腎臓、胸腺、横紋筋、心筋を用いる。抗原MITは小脳及び前脳に存在するが、他の組織では検出されない。ドット中の抗原濃度を段階的に減少させた実験では、MIT-23は小脳ホモジエネートの50 μ g/mlで検出されるが10 μ g/mlでは検出されず、組織パネルの陰性メンバーは小脳中で認められるMITが5%以下のものであることを示すものである。

例9： 自己免疫疾患の血清またはマウス中のリウマチ因子及び循環免疫コンプレックスの測定

リウマチ因子は他種のIgGをも含むIgGに結合する血清中に認められる免疫グロブリンとして定義される。循環免疫コンプレックスはある種の異常で循環系に認められる内性抗原-抗体コンプレ

ックスを封鎖溶液に入れ、抗体結合反応を、抗体の活性によつて2時間から一夜続ける。媒質を次に除去し、過剰の抗体をTBSで十分に洗浄して除く。次いで結合した免疫グロブリンを前記の例と同様に処理してベルオキシダーゼ結合ヤギ-抗マウスIgGにより特異的に着色させる。480の容器のうち170について陽性が検出される。

この操作は任意の抗原または抗原の混合物に対する交雑腫瘍をスクリーニングするためのキットの調製に用いることができる。シートや四角片で免疫化する場合には、通常のプラスチック製皿で免疫化する場合よりも抗原を容易に取扱い貯蔵できる利点があり、Costar皿の全容器を抗原でコーティングする場合よりも少ない抗原ですますことができ、Millipore上の背景部の着色と抗原に結合している抗体とを直接比較できるので高い識別感度を得られると共に背景部の高い反応性による偽陽性を除去することができる。

例8： モノクローン抗体により認識されるラット脳抗原の組織分布(MIT-23)

ックスである。これらは共に結合組織疾患の診断の一部でしばしば測定される。ウサギIgG(Nordic)がリウマチ因子の試験として用いられ、ヒトC1qが免疫コンプレックスの試験として用いられる。

ウサギIgG及びC1qをTBS中に1 μ g/ml溶かし、0.5 μ Lのスポットをニトロセルロースに適用する。次にシートを前記の例と同様にしてTBS-10%ウマ血清により封鎖するヒト自己免疫血清(SLE: 例7のNo 7、MCTD: 例4のNo 11及び正常コントロール)、先天的に自己免疫疾患に敏感な近交系株MRLのマウス血清、及び非自己免疫BALB/c株のコントロールを全てTBS中の10%ウマ血清で100、1000及び10000倍に希釈し、シートをこれらの希釈液の存在下で室温にて一夜インキュベーションする。次に試料をTBSで洗浄し、ヒト血清についてはベルオキシダーゼ結合ウサギ抗-ヒト免疫グロブリンの、またマウス血清についてはウサギ抗-マウス免疫グロブリンの、TBS-10%ウマ血清中の1/1000希釈液を用いてインキ

ユベーションする。後者の2つの検出抗血清はDAKO(コペンハーゲン、デンマーク)から得たものである。次に試料を更に2時間室温でインキュベーションする。次いで過剰の検出抗体をTB3で洗出させ、結合抗体を例5のようにしてクロノフトール反応により検出する。着色を更に2時間展開させて結果を判読する。

ヒト自己免疫血清は二つとも1:1000の希釈液まで意味のある量のリウマチ因子を示すが、コントロール血清ではどの希釈液にもリウマチ因子は認められない。マウス自己免疫血清は1:10000の希釈液まで陽性の反応を示すがコントロールマウスでは100倍希釈血清が陽性反応を検出できるボーダーラインである。従つてこの検出では疾患のあるヒト及びマウスの血清中の高滴定濃度の抗-ウサギIgGの存在が検出される。免疫コンプレックスはコントロール血清の約10倍の滴定濃度の病理血清においても検出される。高滴定濃度の循環コンプレックスは、自己免疫マウス血清、ヒトMCTD及びSLE血清中で認められる。200

テル”(0.45 μ)

- (4) Gelman Metrical GN6 セルローストリアセテート(0.45 μ)
- (5) Schleicher & Schuell (Schleicher & Schuell GmbH, ダッセル(Dassel), 西ドイツ) ニトロセルロース、(0.15 μ) BA 80/1
- (6) Schleicher & Schuell ニトロセルロース、(0.15 μ) BA 80/1
- (7) Schleicher & Schuell ニトロセルロース(0.8 μ) AE 91/1
- (8) Schleicher & Schuell ニトロセルロース(12 μ) AE 100
- (9) Schleicher & Schuell セルロースアセテート(0.45 μ) OE 67
- (10) Schleicher & Schuell 再生セルロース(0.45 μ) RC 57
- (11) FMC(ロツクランド、メイン州、米国)アガロース“Sea plaque”
- (12) Difco Noble アガー(agar)(Difco Laboratory Inc., デトロイト、ミシガン州、米

のヒトSLE血清の収集及びその生存中採取した20個のMRLマウスの血清試料に関する例でも以上の結果が支持される。

従つて、この例に記載した条件は臨床的診断及び動物モデルシステムの両方においてリウマチ因子と免疫コンプレックスを検出するための実際的なシステムを提供するものである。

例10: ドット免疫-結合検定の支持体としての種々の多孔性材料

種々の多孔性支持体材料を用い、抗原の試料0.5 μ Lを前記の例と同様にして適用する:

支持体:

- (1) New England Nuclear Cor., (ボストン、マサチューセッツ州、米国)の“Gene Screen”(多孔性ポリアミド)
- (2) Gelman (Gelman Science Inc., アンアーバー、ミシガン州、米国)デフロンHT 450(0.45 μ)高温で使用する芳香族ポリスルホンコポリマー
- (3) Gelman Metrical GN6*混合セルロースエス

図)

後の2つはFMCコーポレーションの“Gel Bond”の剛性プラスチック支持体上に、製造業者の指示に従つて施して0.5 μ Lの層を得る。この最後のものは5cmの円内で、表面に溶解したアガー(寒天)またはアガロースを1 μ L適用し、赤外線ランプにより乾燥する。アガーを再び水和すると多孔性構造となる。

以下の抗原を前記の例と同様にして0.5 μ Lの分別量で適用し、風乾し、ヒトSLE血清を用いて同一の処方で処理する(例4のNo 7参照):

- (A) 天然のDNA(0.4 μ g/ml)
- (B) 変性DNA(0.4 μ g/ml)
- (C) インフルエンザウイルス混合物(希釈しないSondvacワクチン)
- (D) ヒトIgG、1 μ g/mlのウシ血清アルブミン中1 μ g/ml
- (E) ヒトIgG、1 μ g/mlのウシ血清アルブミン中10 μ g/ml
- (F) ヒトIgG、1 μ g/mlのウシ血清アルブミン中

100 μ g/ml

(C) 1mg/ml ウシ血清アルブミン

TBS を全ての溶媒に用いる。

DNA 試料を添加後、残りのものを添加する前に着色部を 80℃ にて 2 時間焼成する。

以下のような結果が孔サイズ 0.45 μ の Millipore を用いた標準システムと比較して得られる。

支持体	結 果
(1)	A, C 及び F かすかに見える。他のドットは陰性。
(2)	A, B 及び (C) 着色、D, E, F 及び G 陰性。
(3)	全てのドットが陽性、D, E 及び F は着色度が段階的に変化している。
(4)	A 及び C かすかに陽性、他の全ては陰性背景部はやや高い。
(5)	Millipore と有意の差はない。
(6)	同一の多孔度を持つ Millipore と全く同じ。
(7)	D は着色しない。他は Millipore と同様。

から得たものであり、前記の諸例のようにプリントされたグリッドを有する Millipore のニトロセルローズ (0.45 μ) に、前記の例と同種の配列にて、下記の抗原 0.5 μ l と TBS 中の希釈液 (カツコ内に示した) を施す。

(1) アデノウイルス (1/5)、(2) クラミジア (1/2)、(3) サイトメガロウイルス (希釈せず)、(3a) サイトメガロウイルスコントロール陰性抗原 (希釈せず)、(4) インフルエンザ A (1/4)、(5) インフルエンザ B (1/2)、(6) パラインフルエンザ 1 (希釈せず)、(7) パラインフルエンザ 2 (希釈せず)、(8) パラインフルエンザ 3 (希釈せず)、(8a) インフルエンザコントロール陰性抗原 (希釈せず)、(9) マイコプラズマ (1/2)、(10) Q 熱 (1/2)、(11) 呼吸多核ウイルス (1/2)、及び更に TBS 中 10, 4.65, 2.15 及び 1 μ g/ml のヒト IgG (Nordic) の 4 個の標準液並びにウシ血清アルブミン 1mg/ml。これらは次にベルオキシダーゼ結合ヤギ抗-ヒト IgG (Nordic) の 1:1000 希釈液を用いてグロロナフトール法により、TBS 10% ウマ血清中

- (8) A, B 及び C 着色、D, E, F は Millipore よりも薄い。
- (9) A, C 及び F はかすかに着色。他は陰性。
- (10) A 及び B は陽性、G は薄く他は陰性。
- (11) A, B 及び C は陽性であるが薄い。D, E, F は観測できるボーダーラインである。
- (12) A, B 及び C は陽性、D, E 及び F は弱いが陽性。

寒天は粗い支持体に容易にコーティングされるという長所があり透明であるから、例 5 のように反射率を測定する代わりに透過によつて定量するのに適している。

例 11: 多重ドット検定による呼吸ウイルス抗体プロフィール

この例は、症状のみによつて区別することが困難なグループとして診断のために通常必要とされている呼吸ウイルスのグループをベースに抗原を選定したことを除いて例 3 と同様である。このグループの抗原は Institut Virion (チューリッヒ)

1/100, 1/1000 及び 1/10000 に希釈した血清により前記の例と同様にして検定する。陽性コントロール血清として Institut Viron により提供されたものについての結果をも以下の表に挙げる。

ドット免疫検定により得られた呼吸ウイルス抗体プロフィールの総括

血清 コード	抗原により得られたオリジナル血清中の抗体滴定濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.1	<0.03	0	<0.03	0.15	0.15	0.03	0.15	0.1	0.03	0.33
2	0.07	<0.03	0.07	0.03	0.15	0.07	0.07	0.07	0	0	0.33
3	0.03	0	0	<0.03	0.15	0.15	0.07	0.07	0.03	0	0.33
4	0.07	0.15	0.07	<0.03	0.15	0.15	0.15	0.07	0.03	0	0.72
5	0.03	0	0.07	<0.03	0.03	0.07	0.07	0.07	0	0	0.72
6	0.07	0.03	0	<0.03	0.15	0.1	0.07	0.07	0	<0.03	0.72
7	0.07	2.3	<0.03	<0.03	0.03	0.15	0.07	0.07	0.1	<0.03	0.33
8	0.03	<0.03	0	<0.03	0.03	0.15	0.07	0.07	0.5	3.3	0.33
9	0.03	0.03	0	<0.03	0.03	0.03	0.07	0.07	0.03	<0.03	1.5
10	0.03	<0.03	0.15	<0.03	0.03	0.07	0.07	0.07	0.03	0	0.33
11	0.03	<0.03	0	<0.03	0.03	0	0.07	0.07	0	0	0.33
12	<0.03	<0.03	0	<0.03	0.03	0.15	0.07	0.07	0	0	0.33
13	0.03	<0.03	0.03	<0.03	0.07	0.07	0.07	0.07	0.72	<0.03	<0.33
14	0.03	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07	0.07	0.07	0.1	0.03	0.72
15	0.03	<0.03	0.15	<0.03	0.15	0.15	0.07	0.07	0.1	0.03	0.03
16	0	<0.03	0	<0.03	0.15	0.5	0.07	3.3	0	0.33	3.3
17	0	<0.03	0	<0.03	0.15	0.5	0.07	3.3	0	0.33	3.3
18	0.03	<0.03	0.07	<0.03	<0.03	0.33	0.07	1.5	0.15	0.07	0.7
19	0.07	<0.03	0.03	<0.03	0.07	0.1	0.07	0.07	0.07	0.03	0.33
20	<0.03	0.5	0.03	<0.03	0.07	0.1	0.07	0.07	0.03	0.03	0.33
21	<0.03	<0.03	0.03	<0.03	0.03	0.03	0.07	0.07	0.03	0.33	0.33
22	0.03	0.5	0	<0.03	0.03	0.03	0.03	0.07	0.03	0.33	0.33
23	0.03	<0.03	0.03	<0.03	0.07	0.07	0.03	0.07	0.15	0.33	0.33
24	0.03	0.03	0.33	<0.03	<0.03	0.07	0.03	0.07	0.15	0.03	0.7
25	0.03	0.15	0	<0.03	0.03	0.07	0.03	0.07	0.03	0.15	0.33
26	<0.03	0.07	0	<0.03	0.07	0.03	0.07	0.07	0.07	<0.03	0.15

陰性コントロールとして提供された抗原はどの血清によっても陽性反応を示さない。

例 1 2 : 血清中の呼吸ウイルス抗体プロフィールを得るための補体結合検定とドット免疫結合検定との比較

例 1 1 と同じセットの血清について、Institute Vivon からの同じグループの抗原により、補体結合について述べた物質と手法を用いて補体結合検定を行う。血清は同一の滴定濃度にグループ分けし、次いで滴定濃度が減少する順序で表に示す。下記の表中の垂直線は滴定濃度によるグループ分けである。アンダーラインのある血清はその抗原に対する陽性コントロールとして供給されたものである。

ドット免疫検定による呼吸ウイルス抗体プロフィールと補体結合検定による対応するデータの相関

各例において、左側の欄はドット検定による血清の滴定濃度の順序であり、右側の欄は補体結合検定による順序である。アンダーラインを引いた血清はその特殊抗原に対する陽性コントロールのキットの一部として供給されたものである。

アデノウイルス	オルニトシス (Ornithosis)	インフルエンザ A	インフルエンザ B	パラインフルエンザ I
1	19	2	1	16
2	6	14	2	17
4	7	1	3	18
6	9	3	4	25
7	8	4	6	7
19	1	5	15	3
3	2	6	16	4
5	5	7	17	7
8	25	8	18	8
9	21	9	13	12
10	3	13	19	1
13	4	16	20	2
14	15	17	23	3
15	18	18	26	4
18	10	19	14	5
22	11	20	5	6
23	12	21	7	9
24	13	22	8	10
11	14	23	9	13
12	16	24	10	14
20	17	25	11	15
21	20	26	12	19
25	22	10	21	20
26	23	11	22	21
16	24	12	24	22
17	26	15	25	23
				24
				26

呼吸ウイルス抗体プロフィールの相関 (続き)

パラインフルエンザ 2	パラインフルエンザ 3	マイコプラズマ	Q 熱	呼吸多核ウイルス
4	25	13	8	16
2	15	8	16	17
3	23	18	17	9
5	4	19	22	4
6	7	20	23	5
7	10	24	25	6
8	6	1	18	1
9	8	7	1	2
10	9	14	14	5
11	12	15	15	7
12	21	26	1	8
13	1	9	19	10
14	2	3	20	11
15	3	4	21	18
16	5	10	24	21
17	11	21	7	3
18	13	22	9	4
19	14	23	13	12
20	16	25	26	13
21	17	2	2	14
1	18	3	3	15
22	19	4	4	19
23	20	11	10	20
24	22	12	11	22
25	24	16	12	23
26	26	17	5	24
				26

殆ど全ての場合に陽性血清はほぼ同じランクに入っており、両検定共に陽性として供給された血清は実際上陰性か、低い滴定濃度を示すことが表から理解できる。全ての検定はかなり良い相関を示している。例外的なものがある理由は、2つの検定システムは異なる抗体のクラスを認識するものであり、抗原は2つの検定において非常に異なつた形態で抗体に提供されるからである。

例 13: モノクローン抗体のタイプを決めるためのドット検定の利用

ひな鳥肝臓からのリボソーム蛋白質に対するモノクローン抗体を例 8 と同じ手法により調製し、抗体の特異性を Towbin 等が発表した方法 (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 76, 4350-4354 (1979)) により決める。交雑腫瘍培養物の上澄液について下記のドット検定により抗体のタイプを試験する。Nordie からのタイプ-特異ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を製造業者の指示に従つて溶かし、30 倍に希釈し、1 μ L の分別量をニトロセルロースにドットし、細片を例 1 と同様

にしてウマ血清により封鎖し、希釈しない交雑腫瘍上澄液を用いて室温で一夜インキュベートし、次いで例 1 のようにして結合した抗体を免疫ペルオキシダーゼ着色により検出する。その結果を下記の表に示す。

モノクローン抗体	下記免疫グロブリンに対する抗体による着色	
	IgG	IgM
抗-S6	+	-
抗-L7	-	+
抗-L18a	+	-
抗-P1/P2	-	+
抗-rRNA	-	+

モノクローン抗体は、国際的に認められている命名法により、それらが反応するリボソーム蛋白質により表示される。抗 (Anti)-rRNA はリボソーム RNA に対するものである。表中のタイプは抗体をサクロース濃度を変えて分析した別個の実験により確認されたものである。IgG は沈降定数 7S であり、IgM は 19S である。

この例は適当な検出システムを用いるならば、

抗体がそれらに個々の抗原を検出できることを示すものである。この検定法は臨床的な分析でしばしば必要とされているようにヒト血清中の個々の抗体クラスの量を定量するのに有用である。このシステムにより単一の操作で全てのクラスの抗体を分析し、定量するためのキットを組立てることができる。

例 14: 免疫学上の分析用キット

前記の諸例の抗原を 0.5 μ L 量ドットして装置を組立てる。抗原溶液は前例のようにプリントされたグリッドを有する Millipore シート (孔サイズ 0.45 μ) 上に平行な列になるようにドットする。この場合もシートを 10% ウマ血清で処理し、非特異的結合場所を封鎖して風乾する。シートを細片に裁断して、各細片が 1 個の各抗原のドットを含むようにし、プラスチック製用紙中にシールする。免疫学的分析を行うための試薬は以下のようにして調製する。

- 10% ウマ血清を含む TBS を 100 μ L のロットとして凍結乾燥する。

- ヤギ抗-ヒト免疫グロブリンを 10% ウマ血清を含む TBS 中で 1:1000 に希釈し 100 μ L ロットとして凍結乾燥する。
- TBS を 100 μ L ロットで凍結乾燥する。
- 4-クロロ-1-ナフトールを蛋白質 9 μ g 中に調合し、アンプル中にシールする。
- H₂O₂ (30%) を蛋白質 0.1 μ L 中に調合し、アンプル中にシールする。

期限を定めずに貯蔵した後、前記の諸例に従つて血清中の未知抗体を分析するために上記のキットは以下のようにして使用される。A, B 及び C 各 1 部を蒸留水 100 μ L を用いて元の状態に戻す。次に A を未知血清の希釈液中で用い、B をインジケータ抗体結合反応に用い、また元に戻した C の 1 ロットは D 及び E 各々の 1 アンプルと共に呈色反応混合物とする。C の他のロットは抗体結合の各段階での洗浄に必要なときに元の状態に戻す。前記の諸例と同じ結果が得られる。

4. 図面の簡単な説明

図面は血清の抗体分析において、個々の血清に



忠。

個々の血清に於て試験された細胞

●, ●, ◎: 標準液により得られた3種の呈色濃度抗原の
スロット上に対応する標準液の濃度と比較する。

特許庁長官 殿

- 免疫分析用装置及びキット

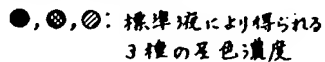
チパー ガイギー アクチエンゲゼルシャフト

第16興和ビル8階

藏里

昭和57年7月9日(同年7月27日発送)

7.補正の内容 別紙の通り



POWERED BY **Dialog**

Device for multiple immunoassay tests - is support sheet with antigen or immunoglobulin reagent adsorbed on specific areas

Patent Assignee: CIBA GEIGY AG; CIBA GEIGY CORP

Inventors: GORDON J; HAWKES R; NIDAY E; TOWBIN H

Patent Family (19 patents, 22 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
EP 63810	A	19821103	EP 1982103520	A	19820426	198245	B
GB 2099578	A	19821208	GB 198113167	A	19810429	198249	E
			GB 198134353	A	19811113		
			GB 19821289	A	19820118		
			GB 198212275	A	19820428		
NO 198201411	A	19821122				198250	E
ZA 198202896	A	19821029				198305	E
FI 198201441	A	19821231				198307	E
JP 58009070	A	19830119				198309	E
DK 198201891	A	19830314				198317	E
BR 198202492	A	19830412				198321	E
PT 74816	A	19831116				198349	E
ES 198400199	A	19840101				198414	E
ES 198405156	A	19840901				198447	E
ES 198405157	A	19840901				198447	E
GB 2099578	B	19850724	GB 198113167	A	19810429	198530	E
			GB 198134353	A	19811113		
			GB 19821289	A	19820118		
			GB 198212275	A	19820428		
IL 65627	A	19851129				198602	E
EP 63810	B	19860305	EP 1982103520	A	19820426	198610	E
CA 1200761	A	19860218				198612	E
DE 3269567	G	19860410				198616	E
US 5486452	A	19960123	US 1982345440	A	19820203	199610	E
			US 1984673211	A	19841119		
			US 1986912144	A	19860924		
			US 198738470	A	19870410		
PH 26773	A	19920928	PH 198227205	A	19820428	199634	E

Priority Application Number (Number Kind Date): GB 19821289 A 19820118; GB 198134353 A

19811113; GB 198113167 A 19810429; GB 198212275 A 19820428

Patent Details

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
EP 63810	A	EN	66		
Regional Designated States, Original	AT BE CH DE FR IT LI LU NL SE				
ZA 198202896	A	EN			
BR 198202492	A	PT			
IL 65627	A	EN			
EP 63810	B	EN			
Regional Designated States, Original	AT BE CH DE FR IT LI LU NL SE				
CA 1200761	A	EN			
US 5486452	A	EN	17	1	Continuation of application US 1982345440
					Continuation of application US 1984673211
					Continuation of application US 1986912144
PH 26773	A	EN			

Alerting Abstract: EP A

Assay device comprises a porous solid support carrying an array of adsorption areas of antigens (Ag) and/or immunoglobulins (IgG), prepd. by applying Ag or IgG directly as a soln. or suspension. Any residual adsorption sites, outside or inside the specified areas, are satd. by proteins which are non-specific for Ag and IgG. Pref. this satn. is by treatment with total serum, opt. diluted with physiological saline, at room or elevated temp. then opt. drying and baking.

Pref. the support is about 0.1 mm thick made of natural carbohydrate or hydrocarbon polymers; proteins; synthetic porous polymers; porous inorganic materials or mixts. or copolymers. Also new are kits consisting of such a device plus appropriate reagents.

The devices are used for immunoassays and allow an almost unlimited no. of assays can be carried out simultaneously. Particularly, they are useful for screening hybridomas making monoclonal antibodies and for mlti-parameter antibody assays to establish an antibody profile. Very small amts. of Ag and IgG are needed, the microporous sheets have a high binding capacity and are easy to wash.

International Classification (Main): G01N-033/543, G01N-033/548 **(Additional/Secondary):** C12M, G01N-033/54, G01N-033/564, G01N-033/569

US Classification, Issued: 435005000, 435007100, 435007200, 435007210, 435007220, 435007230, 435007310, 435007320, 435007700, 435007720, 435007900, 435007910, 435007920, 435007940,

435007950, 435970000, 435975000, 436506000, 436507000, 436509000, 436518000, 436530000, 436807000, 436821000

Original Publication Data by Authority

Brazil

Publication Number: BR 198202492 A (Update 198321 E)

Publication Date: 19830412

Language: PT

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Canada

Publication Number: CA 1200761 A (Update 198612 E)

Publication Date: 19860218

Language: EN

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Germany

Publication Number: DE 3269567 G (Update 198616 E)

Publication Date: 19860410

Language: DE

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Denmark

Publication Number: DK 198201891 A (Update 198317 E)

Publication Date: 19830314

Language: DA

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

European Patent Office

Publication Number: EP 63810 A (Update 198245 B)

Publication Date: 19821103

****Pruefmittel und Ausruestung fuer immunologische Analysen New devices and kits for immunological analysis Dispositif et troussees pour les analyses immunologiques****

Assignee: CIBA-GEIGY AG, Patentabteilung Postfach, CH-4002 Basel, CH (CIBA)

Inventor: Gordon, Julian, Dr., Finkelerweg 40, CH-4144 Arlesheim, CH Hawkes, Richard, Dr., Beim Lindenbaum 15, CH-4123 Allschwil, CH Niday, Evelyn, Dr., 1830 N. Stratford Road, Arlington Heights Illinois 60004, US Towbin, Harry, Dr., Binningerstrasse 12, CH-4123 Allschwil, CH

Agent: Zumstein, Fritz sen., Dr., et al, Braeuhausstrasse 4, D-8000 Muenchen 2, DE

Language: EN (66 pages)

Application: EP 1982103520 A 19820426 (Local application)

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE FR IT LI LU NL SE

Original IPC: C12M-0/00 G01N-33/54

Current IPC: C12M-0/00 G01N-33/54

Original Abstract: New devices and kits for immunological analysis. The invention relates to new devices and kits for immuno-assays, especially solid-phase immuno-assays, comprising a solid porous support, preferably in the form of a sheet, where antigens or immunoglobulins, or both of them, are

bound by direct application, with no other chemical or electrochemical treatment. The use of such supports makes possible to effect an unlimited number of antibody-antigen, reactions simultaneously and in one operation. The assays with these new kits are technically extremely simple in practice. The antigens or immunoglobulins on the solid support can be applied in any suitable pre-selected geometry, e.g. as an array of dots, preferably micro-dots, or lines. A preferred material for the solid support is nitrocellulose or nitrocellulose mixed with other cellulose esters. Before carrying out the immuno-assays residual adsorbing sites on the support must be saturated with whole serum of heterologous species to prevent nonspecific binding. The invention is also directed in particular to devices and kits treated in this manner, and, if desired, washed and dried. They can be stored for an indefinite time without loss of activity. In the immuno-assays to be carried out according to the present-invention the preferred detection system is the use of anti-primary species antibody coupled to peroxidase with a chromogenic substrate. The color intensity can be quantitated and calibrated with standards of known amounts of immunoglobulins bound to the same support. Densitometry permits the evaluation of the color reaction over a 1000-fold range of concentrations. The new kits can also be used with specific antibodies in a pre-determined array on the solid support for the detection of specific antigens and with complement proteins to detect antigen-antibody complexes. [EP 63810 B (Update 198610 E)]

Publication Date: 19860305

****Pruefmittel und Ausruestung fuer immunologische Analysen New devices and kits for immunological analysis Dispositif et troussees pour les analyses immunologiques****

Assignee: CIBA-GEIGY AG, Klybeckstrasse 141, CH-4002 Basel, CH

Inventor: Gordon, Julian, Dr., Finkelerweg 40, CH-4144 Arlesheim, CH Hawkes, Richard, Dr., Beim Lindenbaum 15, CH-4123 Allschwil, CH Niday, Evelyn, Dr., 1830 N. Stratford Road, Arlington Heights Illinois 60004, US Towbin, Harry, Dr., Binningerstrasse 12, CH-4123 Allschwil, CH

Agent: Zumstein, Fritz, Dr., et al, Braeuhausstrasse 4, D-8000 Muenchen 2, DE

Language: EN

Application: EP 1982103520 A 19820426 (Local application)

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE FR IT LI LU NL SE

Original IPC: G01N-33/543

Current IPC: G01N-33/543(A)

Claim: Assay device comprises a porous solid support carrying an array of adsorption areas of antigens (Ag) and/or immunoglobulins (IgG), prep'd. by applying Ag or IgG directly as a soln. or suspension. Any residual adsorption sites, outside or inside the specified areas, are sat'd. by proteins which are non-specific for Ag and IgG. Pref. this satn. is by treatment with total serum, opt. diluted with physiological saline, at room or elevated temp. then opt. drying and baking. Pref. the support is about 0.1 mm thick made of natural carbohydrate or hydrocarbon polymers; proteins; synthetic porous polymers; porous inorganic materials or mixts. or copolymers. Also new are kits consisting of such a device plus appropriate reagents. The devices are used for immunoassays and allow an almost unlimited no. of assays can be carried out simultaneously. Particularly, they are useful for screening hybridomas making monoclonal antibodies and for mlti-parameter antibody assays to establish an antibody profile. Very small amts. of Ag and IgG are needed, the microporous sheets have a high binding capacity and are easy to wash. (66pp)

Spain

Publication Number: ES 198400199 A (Update 198414 E)

Publication Date: 19840101

Language: ES

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428[ES 198405156 A (Update 198447 E)]

Publication Date: 19840901

Language: ES

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428[ES 198405157 A (Update 198447 E)]

Publication Date: 19840901

Language: ES

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Finland

Publication Number: FI 198201441 A (Update 198307 E)

Publication Date: 19821231

Language: FI

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Great Britain

Publication Number: GB 2099578 A (Update 198249 E)

Publication Date: 19821208

Language: EN

Application: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428 (Local application)|GB 2099578 B (Update 198530 E)

Publication Date: 19850724

Language: EN

Application: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Claim: A member selected from the group consisting of a device for immunological analysis consisting of a porous solid support in the shape of a film, sheet, plate, or cylinder containing a pre-selected array of delimited adsorption areas of antigens or immunoglobulins or of both of them, which adhere tightly and do not spread out on the porous surface obtainable by applying aliquots of solutions or suspensions of one or more antigens or immunoglobulins or of both of them to the support by direct contact through mechanical transfer, and such a device wherein residual adsorption sites outside or inside the antigen or immunoglobulin areas are saturated by the presence of proteins which are non-specific with regard to their capacity of reacting with the mentioned antigens or immunoglobulins.e

Israel

Publication Number: IL 65627 A (Update 198602 E)

Publication Date: 19851129

Language: EN

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Japan

Publication Number: JP 58009070 A (Update 198309 E)

Publication Date: 19830119

Language: JA

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Norway

Publication Number: NO 198201411 A (Update 198250 E)

Publication Date: 19821122

Language: NO

Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

Philippines

Publication Number: PH 26773 A (Update 199634 E)
Publication Date: 19920928
Assignee: CIBA GEIGY AG (CIBA)
Inventor: GORDON J HAWKES R TOWBIN H NIDAY E
Language: EN
Application: PH 198227205 A 19820428 (Local application)
Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118
Original IPC: G01N-33/543(A)
Current IPC: G01N-33/543(A)

Portugal

Publication Number: PT 74816 A (Update 198349 E)
Publication Date: 19831116
Language: PT
Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB 198212275 A 19820428

United States

Publication Number: US 5486452 A (Update 199610 E)
Publication Date: 19960123
Devices and kits for immunological analysis
Assignee: Ciba-Geigy Corporation (CIBA)
Inventor: Towbin, Harry Niday, Evelyn Gordon, Julian, CH Hawkes, Richard
Agent: Fishman, Irving M. Kaiser, Karen G.
Language: EN (17 pages, 1 drawings)
Application: US 1982345440 A 19820203 (Continuation of application) US 1984673211 A 19841119 (Continuation of application) US 1986912144 A 19860924 (Continuation of application) US 198738470 A 19870410 (Local application)
Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118
Original IPC: G01N-33/548(A) G01N-33/564(B) G01N-33/569(B)
Current IPC: G01N-33/548(A) G01N-33/564(B) G01N-33/569(B)
Original US Class (main): 4355
Original US Class (secondary): 4357.1 4357.2 4357.21 4357.22 4357.23 4357.31 4357.32 4357.7 4357.72 4357.9 4357.91 4357.92 4357.94 4357.95 435970 435975 436506 436507 436509 436518 436530 436807 436821
Original Abstract: New devices and kits for solid-phase immuno-assays comprising a solid porous support, preferably in the form of a sheet, where antigens or immuno-globulins or both of them are bound by direct application in any suitable geometry, e.g. as an assay of dots or lines. Such porous supports are suitable for effecting an unlimited number of antibody-antigen reactions simultaneously and in one operation.
Claim: 1. An immunological analysis device consisting of a porous sheet of nitrocellulose containing an array of preselected geometry of delimited absorption areas of at least one compound capable of specifically binding an antigen (antigen-reactive compound) which adheres tightly and does not spread out on the surface of said porous sheet, said array of preselected geometry being obtained in said porous sheet by applying liquid aliquots of said antigen-reactive compound to said porous sheet mechanically via direct contact, wherein residual absorption sites in said porous sheet are unsaturated or saturated by non-specific protein.

South Africa

Publication Number: ZA 198202896 A (Update 198305 E)
Publication Date: 19821029
Language: EN
Priority: GB 198113167 A 19810429 GB 198134353 A 19811113 GB 19821289 A 19820118 GB

198212275 A 19820428

Derwent World Patents Index

© 2007 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 2512950